

THESIS

MÜNICH

1963

ÜBER DEN EINFLUSS MITTELKETTIGER FETTSÄUREN
(C_8, C_9, C_{10}) AUF DIE IN VITRO LIPOIDSYNTHESE,
UNTERSUCHT MIT DER METHODE
DER SÄULENCHROMATOGRAPHIE

Peter Vogel

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR DRIVE
PALO ALTO, CALIF.

AM THE MATHEMATISCHES INSTITUT DER UNIVERSITÄT ZÜRICH
Kocher, Späker Dr. W. 1892

AM THE MATHEMATISCHES INSTITUT DER UNIVERSITÄT ZÜRICH
Dr. C. C. LAUF DR. W. FIEDERLEIN
Kocher, Späker Dr. W. 1892

AM THE MATHEMATISCHES INSTITUT DER UNIVERSITÄT ZÜRICH
Dr. C. C. LAUF DR. W. FIEDERLEIN
Kocher, Späker Dr. W. 1892

AM THE MATHEMATISCHES INSTITUT DER UNIVERSITÄT ZÜRICH
Dr. C. C. LAUF DR. W. FIEDERLEIN
Kocher, Späker Dr. W. 1892

AM THE MATHEMATISCHES INSTITUT DER UNIVERSITÄT ZÜRICH
Dr. C. C. LAUF DR. W. FIEDERLEIN
Kocher, Späker Dr. W. 1892



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153505_0015

AUS DER MEDIZINISCHEN POLIKLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Direktor: Professor Dr. W. Seitz

ÜBER DEN EINFLUSS MITTELKETTIGER FETTSÄUREN
(C₈, C₉, C₁₀) AUF DIE IN VITRO LIPOIDSYNTHESE,
UNTERSUCHT MIT DER METHODE
DER SÄULENCHROMATOGRAPHIE

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfasst und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Peter Vogel
aus Münchberg/Ofr.

München 1963

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Professor Dr. W. SEITZ
Dekan:	Professor Dr. A. HERRMANN

Tag der mündlichen Prüfung: 15. 7. 1963

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Einleitung	5
Problemstellung	6
Methodik	14
Versuchsergebnisse (Tabellen)	20
Versuchsergebnisse (Kurven)	24
Diskussion der Versuchsergebnisse	33
Zusammenfassung	49
Literaturverzeichnis	51

EINLEITUNG

Der Lipidstoffwechsel ist in den letzten Jahren immer stärker in das Interesse der biochemischen Forschung gerückt.

Der Grund dürfte wahrscheinlich darin liegen, dass man:

Erstens, die Mitursachen bestimmter Krankheiten, zum Beispiel der Speicherkrankheiten, der Ateriosklerose usw. in einer Pathogenität des Lipidstoffwechsels sah. Um diese krankhaften Vorgänge zu ergründen, musste man erst einmal den normalen Lipidstoffwechsel aufdecken.

Zweitens erhielt man mit der Verfeinerung der verschiedenen Arten der Chromatographie und mit dem Ausbau der Isotopentechnik Methoden, die eine völlige Auftrennung der Lipoide, die Gewinnung von Zwischenprodukten und die Aufklärung der Struktur dieser Produkte ermöglichte. Auf diese Weise konnten bereits bedeutende Ergebnisse gewonnen werden.

Eine weitere Möglichkeit, einen Einblick in die Vorgänge des Lipidstoffwechsels zu gewinnen, besteht darin, dass man durch Beeinflussung des normalen Syntheseganges Licht in die Vorgänge des Organismus bringt. Das kann auf verschiedene Weise geschehen, zum Beispiel durch die Blockierung bestimmter Fermentstufen und die dadurch bedingte Anreicherung von Zwischenprodukten, oder durch die Zugabe von vermuteten Zwischenprodukten, die, wenn sie wirklich im Zusammenhang mit der Synthese stehen, zu Gleichgewichtsverschiebungen und dadurch zu Änderungen der Synthesemenge führt.

Wenn man nun solche Beeinflussungen richtig beurteilen will, ist es notwendig, sich mit der Leistungsfähigkeit der Trennungsmethode, den bereits bekannten oder vermuteten Synthesewegen der gewonnenen Produkte und vor allem mit den Grundlagen der biochemischen Katalyse, insbesondere mit den Fermenten zu befassen.

CHROMATOGRAPHIE

Nach Zechmeister (1) verstehen wir im Allgemeinen darunter all diejenigen Vorgänge, welche die Trennung der Substanzen aus einem Stoffgemisch und ihre selektive Fixierung auf der festen Oberfläche eines Trägers mit Hilfe einer strömenden Flüssigkeit in einer definitiven Richtung gestatten.

Diese erstmals von dem russischen Botaniker M. Tswet (1906) entwickelte Trennungsmethode beruht darauf, dass die zu trennenden Stoffe von der Oberfläche des Adsorbens mit ungleicher Affinität festgehalten werden; d. h. dass die Gleichgewichtsverteilung der einzelnen Stoffe zwischen dem Lösungsmittel und der Oberfläche des Adsorbens verschieden ist (28). Als Adsorptionsmittel werden Stoffe mit sehr grosser Oberflächenwirkung (z. B. Kieselgur, Tier- und Pflanzenkohle, Talkum usw.) verwendet.

Bei der quantitativ ergibigsten Trennungsmethode, die auf diesem Prinzip beruht, der Säulenchromatographie, wird das Adsorbens in ein Glasrohr gebracht und mit Lösungsmittel durchtränkt. Dann bringt man das Lipoidgemisch auf diese Säule. Je nach Affinität zum Adsorbens wandern die einzelnen Stoffe des Gemisches verschieden schnell nach unten und verteilen sich als getrennte Zonen über die Säule. Zur weiteren Entwicklung kann man solange Lösungsmittel nachschicken, bis die einzelnen Zonen der Reihe nach die Säule völlig verlassen haben; oder man entfernt die Säule aus dem Glasrohr, zerlegt sie und löst die auf diese Weise getrennten Stoffe mit den entsprechenden Lösungsmitteln heraus.

Die Säulenchromatographie ist für die Trennung von Lipoiden aus mehreren Ursachen gut geeignet:

1. Die Trennung der verschiedenartigsten Lipide kann in einem Arbeitsgang erfolgen
2. Wie schon erwähnt, kann man es mit dieser Methode zur Anreicherung quantitativ geringer Lipoidfraktionen bringen
3. Es kommt zur Darstellung präperativ und analytisch weiter verwendbarer Substanzmengen

Die Nachteile der Säulenchromatographie beruhen nach Zöllner (2) und nach unseren eigenen Erfahrungen

1. auf dem grossen apparativen Aufwand
2. auf der umständlichen Analytik der Fraktionen
3. auf der noch unvollständigen Auftrennung nahe verwandter Lipoidklassen
4. auf einem sehr grossen Zeitaufwand

Bei der Trennung der Lipide gelang es folgende Lipoidgruppen zu isolieren:

1. Cholesterinester
2. Triglyceride
3. freies Cholesterin
4. Mono-, Diglyceride
5. Phosphatide

(siehe Methodik)

In dem folgenden Kapitel sollen die wesentlichen Tatsachen, die von den einzelnen Lipoidgruppen bekannt und für unseren Versuch von Bedeutung sind, kurz aufgeführt werden.

I. Cholesterin

Das in unserem Versuch in der ersten Trennungsphase erscheinende Cholesterin wurde schon im 18. Jahrhundert von Konradi gefunden. Windaus und Wiedemann klärten später die Struktur dieses Cyclopentanoperhydrophenantrengrundgerüsts an das sich noch Seitenketten anschliessen auf.

Das Cholesterin, - in der Natur kommt es hauptsächlich in tierischen Fetten vor - ist wie an Hand von Bilanzversuchen nachgewiesen wurde, kein essentieller Nahrungsbestandteil. Die im Körper vorgefundene Cholesterinmenge erwies sich immer als ein vielfaches der in der Nahrung zugeführten Menge.

Gebildet werden kann es mit Ausnahme des Gehirns in allen Organen. In der Hauptsache wird es jedoch in der Leber und in der Nebennierenrinde aufgebaut.

Rittenberger und Schönheimer (3) konnten durch Versuche mit D_2O nachweisen, dass Cholesterin aus kleinsten Bruchstücken aufgebaut wird. Little und Bloch (4) sowie Wuersch, Huang und Bloch (5) zeigten, dass markierte Essigsäure in den Steranring eingebaut wird.

Heute ist der Syntheseweg weitgehend durch Lynen (6) geklärt worden und führt über die Essigsäure und Acetessigsäure zur β -Methyl-hydroxyl-Glutarinsäure, die in die β -Dioxy- β -methyl-Valeriansäure (= Mevalonsäure) übergeführt wird. (Ungeklärt sind hierbei noch die Übergangsstufen). Die Mevalonsäure geht über das Isopentylpyrophosphat und Geranylpyrophosphat in das Farnesylpyrophosphat über. Die Verbindung von zwei Molekülen Farnesylpyrophosphat ergibt Squalen, die Vorstufe des Cholesterins. Dabei wird ein Molekül Phosphat frei.

Die Bedeutung des Cholesterins liegt einmal darin, dass es wahrscheinlich die Grundsubstanz aller Steroidhormone darstellt. Für diese Annahme sprechen folgende Versuche:

1. Gibt man Schwangeren Deuterium-haltiges Cholesterin, so wird im Harn Pregandiol mit einer hohen Konzentration an Deuterium ausgeschieden.
2. Steroidhormonbildende Organe enthalten sehr viel Cholesterin.

Das heisst jedoch nicht, dass das Cholesterin immer die Zwischenstufe für die Steroidhormone sein muss. Diese können auch direkt aus C_2 -Bruchstücken aufgebaut werden.

Weiterhin dient das freie Cholesterin, das sich in Gegenwart von Pankreassaft mit Fettsäuren verbinden kann, zur Resorbierbarmachung derselben.

Ob ein erhöhter Cholesterinspiegel im Blut Ursache für die Atherosklerose ist, konnte bisher noch nicht eindeutig geklärt werden.

II. Triglyceride

Die Triglyceride - man versteht darunter ein dreifach mit Fettsäuren verestertes Glycerin - bilden die Hauptmenge der Körperlipoide.

Sie werden grösstenteils mit der Nahrung aufgenommen, können aber auch im Organismus, z. B. aus Kohlenhydratüberschüssen, neu gebildet werden.

Der Auf- und Abbau der Fette, sowie der Umbau, findet vorwiegend in der Leber statt und steht in diesem Organ im Vergleich zu anderen Umsetzungen an erster Stelle.

Soweit es sich um Neubildungen von Triglyceriden handelt, kommt es zu folgenden Aufbauvorgängen.

Das notwendige Glycerin entsteht im Kohlenhydratstoffwechsel beim Abbau der Glucose in Form des Glycerophosphates.

Die Synthese der Fettsäuren kann von staten gehen aus Acetatbruchstücken durch eine Umkehrung des β -Oxydationsvorganges oder aber, wenn bereits mittelkettige Fettsäuren vorhanden sind (nicht C8 - C11) z. B. Laurin- und Myristinsäure, so werden diese durch Anhängen von C2 Bruchstücken in C16 oder C18 Säuren umgewandelt. Das ausschliessliche Vorkommen von geradzahlig Fettsäuren in der Natur lässt sich aus obigen Synthesevorgängen leicht erklären.

Im Organismus besteht weiterhin die Tendenz, dass jeder Aufbau oder Umbau von Fettsäuren zu C16 oder C18 Säuren führt, die gesättigter oder ungesättigter Natur sein können.

Nicht aufgebaut werden die sogenannten essentiellen Fettsäuren. Wir verstehen darunter die Linolsäure (9, 12, Oktadecadiensäure), die Linolensäure (9, 12, 15, Oktadecadiensäure), und die Arachidonsäure (5, 8, 11, 14, Eikosatetraensäure). Ihre lebensnotwendige Funktion besteht darin, dass sie der Ausgangspunkt für die Bildung hoch ungesättigter Fettsäuren (Kettenlänge C22 - C24 und länger) sind, die wir vor allem als Fettsäurebestandteile der Phosphorlipide vorfinden.

Die Vereinigung des Glycerins mit den Fettsäuren findet nach Bloch (7) wie folgt statt:

1. Die Fettsäuren in Form von Acyl - CoA - Derivaten bilden mit dem Glycerinphosphat unter Einwirkung eines Enzyms zuerst ein Mono-, dann ein Diglyceridphosphat (Phosphatidsäure), wobei zwei CoA - SH Verbindungen freigesetzt werden. (Hierdurch erneute Aktivationsmöglichkeit von Acetatbruchstücken)
2. Durch Einwirkung einer Phosphatase wird das Diglycerid desphosphoriliert und eine weitere Fettsäure unter Abspaltung von CoA - SH gebunden.

Die Triglyceride werden also über die Mono- und Diglyceridform aufgebaut, wobei die entstehende Phosphatidsäure eine Intermediärstufe der Fettsynthese darstellt. (Siehe auch Kap. Synthese der Phosphatide)

Da die Kohlenhydratreserve des Körpers begrenzt ist, und Eiweiss überhaupt nicht gespeichert wird, stellen die Neutralfettdepots den einzigen grösseren Energievorrat des Körpers dar. Ausserdem wird Fettgewebe im Körper als Isolations-

schicht, Druckpolster (Hand und Fussohle), Gleit- und Fixierungsmittel (Elastizität der Haut und Fixierung der Niere) verwendet. Die Fähigkeit des Organismus, Kohlenhydrate in Fett (und umgekehrt) umzuwandeln, ermöglicht erst eine begrenzte Unabhängigkeit von der Grösse der Nahrungsmittelzufuhr.

III. Carotinoide, Mono- und Diglyceride

In der 4. Fraktion unserer Trennungsreihe erhalten wir die Mono- und Diglyceride, sowie Carotinoide.

Bei den Carotinoiden handelt es sich um eine Reihe gelber Farbstoffe, die sich aus rein aliphatischen Kohlenwasserstoffketten aufbauen und an den Enden ein oder zwei sechsgliedrige Kohlenwasserstoffringe aufweisen. Der Farbstoffcharakter beruht auf einem System konjugierter Doppelbindungen (Polyene).

Für den Menschen, der vermutlich keine Carotinoide synthetisieren kann, ist das β -Carotinoid lebensnotwendig (Vorstufe des Vit. A). Es wird in der Nahrung meist zusammen mit den Fetten aufgenommen und im Darm und vor allem in der Leber in das Vit. A umgewandelt.

Braithwaite und Goodwin (8) klärten den Syntheseweg, wie er sich bei bestimmten Pilzen abspielt, mit der Isotopentechnik. Ausgangspunkt ist die aktive Essigsäure, als Zwischenprodukt konnte, wie bei den Steroiden, Mevalonsäure nachgewiesen werden.

Ob die Vögel in der Lage sind, Carotinoide zu bilden, konnten wir nicht feststellen. Auf jeden Fall kommt es zur Speicherung von Carotinoiden in der Vogelleber.

Die Mono- und Diglyceride stellen die Vorstufe der Phosphatide und Triglyceride dar. (Über ihren Aufbau siehe Kap. Triglyceride und Phosphatide).

IV. Phosphatide

Bei den Phosphatiden, die wir als Ganzes in der 5. Fraktion erhalten, muss man zwei Gruppen unterscheiden.

1. Die Glycerinphosphatide, so genannt, weil wir hier Glycerin als Baustein neben der Orthophosphorsäure, den Fettsäuren und den stickstoffhaltigen Basen finden.

Je nachdem, welche Base nun über ein Hydroxyl mit der Glycerinphosphorsäure verestert wird, unterscheiden wir:

- a) die Lecithine, sie enthalten als Base Cholin
- b) die Kephaline, sie enthalten Colamin oder Serin.

Als Fettsäurekomponenten finden wir bei den Glycerinphosphatiden Palmitin-, Stearin-, Öl-, und Arachidonsäure. Dazu noch in ziemlichem Ausmass hoch ungesättigte Fettsäuren der C20 - C22 Reihe. Bezeichnend für die Glycerinphosphatide ist das Überwiegen ungesättigter Fettsäuren im Gegensatz zu den Reservefetten.

2. Die zweite Gruppe wird von den Sphingosinphosphatiden gebildet. Der

Aufbau ist ähnlich der Glycerinphosphatide, nur dass sie an Stelle des Glycerins das Sphingosin besitzen, einen zweiwertigen Alkohol mit 18 C - Atomen von der Formel $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{12}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CHOH}-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{CH}_2\text{OH}$. Die Fettsäuren, es sind hier neben der Stearinsäure nur Fettsäuren mit 24 C - Atomen eingebaut, werden an der NH_2 - Gruppe des Sphingosins amidartig gebunden.

Die Phosphatide kommen in allen Zellen vor; gehäuft findet man sie im Gehirn, Nebenniere und im Blutstroma. Das Verhältnis zwischen Lecithin und Kephalin ist in den einzelnen Organen Schwankungen unterworfen. Kephaline findet man, wie der Name sagt, vorwiegend im Gehirn, während Lecithine überwiegend im Blut vorkommen. Im Gegensatz zu den Glycerinphosphatiden, die im Pflanzen- und Tierreich verbreitet sind, findet man die Sphingomyeline auf das Tierreich beschränkt. Dort bilden sie einen wesentlichen Bestandteil der Nervensubstanz.

Der Organismus ist in der Lage, wie Versuche mit radioaktivem P_{32} und markierten Fettsäuren von Chaikoff (9) und Goldmann (10) gezeigt haben, aus Phosphorsäure, Glycerin oder Sphingosin, Fettsäuren und Stickstoffbasen Phosphatide aufzubauen. Dabei ist die Synthesegeschwindigkeit bei den einzelnen Gruppen verschieden. So werden Sphingomyeline im allgemeinen langsamer aufgebaut als Glycerine, während bei diesen die Lecithine in der Leber und im Darm und die Kephaleine im Gehirn rascher synthetisiert werden.

Der eigentliche Mechanismus der Phosphatidsynthese wurde erst durch Kennedy und Weiss (11) aufgeklärt. Sie zeigten, dass auch die Bildung der Phosphatide, wie die der Triglyceride, über ein Diglyceridphosphat führt. Dieses Diglyceridphosphat wird dephosphoriliert. Der Phosphor der Phosphatidsäure wird also nicht verwendet. An der nun freien 3. -OH Gruppe des Glycerins wird Cholin- oder Colaminphosphat esterartig gebunden. Den Vorgang katalysiert ein erst seit kurzem bekanntes und in seiner Struktur aufgeklärtes Co - Ferment, das Cytidindiphosphat.

Im einzelnen läuft der Vorgang wie folgt ab:

1. Die Bildung des Co-Ferments durch Phosphorilierung von Cholin durch ATP.
 $\text{ATP} + \text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_3 = \text{P}-\text{O}-\text{P}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_3$
2. Verbindung des Phosphorcholins mit Cytidintriphosphat:
 $\text{P}-\text{O}-\text{P}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_3 + \text{Cyt.}-\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{P}$
 $\Rightarrow \text{Cyt.}-\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_3 + \text{P}-\text{O}-\text{(aktivierendes Ferment: Phosphorcholin - Cytidintransferase)}$
3. Veresterung des Cytidindiphospharcholins durch eine Diglycerictransferase mit dem Diglycerid:
 $\text{Diglycerid} + \text{Cyt.}-\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_3$
 $\Rightarrow \text{Phosphatid} + \text{Cyt.}-\text{O}-\text{P}$

Das Cytidimonophosphat wird durch ATP wieder in das Triphosphat übergeführt.

Die Bedeutung der Phosphatide besteht darin, dass sie die Fettsäuren aus der Leber abtransportieren; das besagt jedoch nicht, dass sie die generelle Transportform der Fettsäuren darstellen (10). Wird z. B. Cholin in nicht ausreichendem Masse

aufgenommen, so geht die Phosphatidbildung zurück, wodurch ein Liegenbleiben der von der Leber gebildeten Fette in Form der Triglyceride zustande kommt. Dies konnte anhand von Versuchen von Stetten und Salcedo nachgewiesen werden (12).

FERMENTABHÄNGIGKEITEN

Zum Verständnis der in der Diskussion angeführten Theorien erscheint es nötig, kurz auf die Faktoren einzugehen, die die Fermente in ihrer Wirksamkeit beeinflussen.

1. Der pH-Einfluss

Nach den heutigen Erkenntnissen beruht der pH - Einfluss, der sich in der Änderung der Fermentaktivitätskurve bemerkbar macht, auf der Dissoziation einiger mit dem Substrat direkt reagierender Gruppen des Fermentes. Das sind die wesentlichen substratbindenden Gruppen, das Aktivitätszentrum des Co-Fermentes und dessen Nachbargruppen. Die Dissoziation der mehr oder weniger sauren und basischen Gruppen bewirkt eine Änderung ihrer elektrostatischen Kräfte. Beim pH-Optimum eines Fermentes ist die Ladungsverteilung und die Stärke der elektrischen Felder so ausgebildet, dass der bestmögliche Einfluss auf die Bindekräfte des Reaktionsproduktes ausgeübt wird.

Auf Grund der Kenntnis, die man aus dem Wechselverhältnis zwischen pH-Wert, Dissoziation bestimmter Gruppen und Fermentaktivität gewinnen kann, lassen sich Rückschlüsse auf die eigentlichen Aktivitätszentren gewinnen.

Geringe pH - Verschiebungen haben grosse Aktivitätsverschiebungen zur Folge. Daher ist die Wirkung der Enzyme durch die H - Ionenkonzentration der Zelle genauestens bestimmt. Die H - Ionenkonzentration hängt ihrerseits jedoch ab von der fermentativen Säure- und Basebildung. Dieser pH - Ferment - Zyklus wird damit zu einem automatischen Regulierungsfaktor der Auf- und Abbauvorgänge. (Beispiel: Säureüberschussbildung---pH sinkt---Fermentaktivität lässt nach---Säurebildung geht zurück.)

2. Der Temperatureinfluss

Dieser beruht im wesentlichen auf der Wärme als Spenderin der Aktivationsenergie. Bei zu tiefen Temperaturen kommt es, trotz fermentativer Senkung des Energieniveaus, zu keiner Reaktion mehr. Steigt die Temperatur stark an, so sind Denaturierungen die Folge.

Das Temperaturoptimum liegt für die meisten Fermente bei 40 bzw. 50° Celsius.

3. Antimetabolische Einflüsse

a) Denaturierung des Fermenteiweiss

Diejenige Hemmung, die wir immer wieder als begrenzenden Faktor einer in vitro Reaktion finden, ist die spontan eintretende Denaturierung des Fermenteiweisskörpers (siehe Kap. Apoferment). Bereits kurzes Lagern von Fermenten bei Zimmertemperatur ruft Änderungen in ihrer komplizierten Struktur hervor und macht sie damit unbrauchbar. Künstlich können Fermente durch Wärme, organische Lösungsmittel, H⁺-Ionenkonzentrationen, Aussalzen und Oxydationsmittel denaturiert werden.

b) Kompetitive Hemmung

Sie beruht darauf, dass

aa) ein substratähnliches oder

bb) ein eigenes Reaktionsprodukt

als Konkurrent des Substrates die Bindegruppen des Apoferments besetzt, jedoch um Co - Ferment nicht zur Reaktion kommt. Beispiel für aa): Hemmung der Succinodehydrase durch Malonsäure; für bb): Hemmung der Sacherase durch Glukose und Fruktose. (16). Ein Charakteristikum für die kompetitive Hemmung ist eine Steigerung der Michaeliskonstanten gegenüber dem Normalwert.

c) Unkompetitive Hemmung

Hemmkörper verbindet sich weder mit dem freien Encym noch mit dem Substrat, greift aber den Encym - Substratkomplex an. (17). Beispiel: Hemmung der oxidierten Form des Atmungsfermentes durch Acidionen. Die Michaeliskonstante ist hier vermindert.

d) Nichtkompetitive Hemmung

Ein völlig strukturunähnlicher Hemmkörper bindet sich an die Wirkgruppe des Co - Ferments. Obwohl das eigentliche Substrat an das Apo - Ferment gebunden werden kann, kommt eine Katalyse natürlich nicht mehr zustande. Diese Hemmung ist unabhängig von der Substratkonzentration. Beispiel: Hemmung durch Metallionen. Die Michaeliskonstante ist bei dieser Hemmung unverändert.

e) Hemmung durch Substratüberschuss

Diese Hemmung kann auf verschiedene Weise erfolgen:

aa) Das überschüssige Substrat besetzt die aktivitätsfördernden Zentren, also die Nachbargruppen des Aktivitätszentrum des Co-Fermentes. Folge: diese Gruppen verlieren ihre Wirksamkeit, die Synthese lässt nach.

bb) Überschüssiges Substrat kann sich (siehe unkompetitive Hemmung) an einen Encym - Substrat - Komplex binden und dadurch hemmend wirken.

cc) Überschüssiges Substrat hat auch die Tendenz, neben einem aktiven, einen inaktiven Encym - Substrat - Komplex zu bilden, wodurch in

zunehmenden Masse das betreffende Ferment inaktiviert wird.
Die optimale Substratkonzentration errechnet sich nach der Formel:

$$\frac{1 + n}{\sqrt{\frac{K_m + K_i}{n}}}$$

K_i = Hemmungskonstante; K_m = Michaeliskonstante;

Bestimmung der Hemmungskonstante erfolgt nach Dixon (18).

Die Versuchsanordnung gliedert sich in 4 Teile:

- I. Vorbereitungen zur Säulenchromatographie.
- II. Herstellung des Lipoidextraktes.
- III. Chromatographische Trennung der Lipide.
- IV. Messung der einzelnen Lipoidfraktionen.

I. Vorbereitung zur Säulenchromatographie:

A. Reinigung des Kieselgels.

Man entnimmt der Originalabfüllung: "Mallinckrodt-Kieselsäure" (Serva Heidelberg) 100 g Kieselsäure. Diese Menge wird nun zuerst durch zweimaliges Waschen mit je einem Liter Methanol und anschliessend durch zweimaliges Waschen mit 1 Liter Äther vorbereitet. Hierbei verfährt man folgendermassen:

1. 100 g Kieselgel in 1 Liter Messzylinder
2. Mit Methanol bis 1000 ccm auffüllen, aufrühren, 30 Minuten absetzen lassen, Überstand mit Wasserstrahlpumpe absaugen.
3. Derselbe Vorgang wiederholt sich mit 1000 ccm Methanol.
4. In gleicher Weise 2 mal mit 1000 ccm Äther behandeln.

Das ätherfeuchte Kieselgel wird jetzt in einem möglichst grossflächigem Gefäss zuerst an der Luft und später bei 110 Grad Celsius im Trockenschrank getrocknet.

B. Säubern der Glassäule

Das Kieselgel wird jeweils nur für einen Versuch verwendet. Die Reinigung der Säule geht folgendermassen vor sich:

1. Die Säule wird mit warmen Wasser gefüllt, das Kieselgel und die beiden Filter mit einem spitzen Glasstab ausgeschwemmt.
2. Anschliessend wird nachgespült:
 - a) 10 mal mit heissem Wasser
 - b) 10 mal mit aqua dest.
 - c) 5 mal mit Methanol (Warten bis die Säule gut tropft)
 - d) 5 mal mit Äther
3. Zuletzt wird die Säule durch Einblasen von Stickstoffgas noch völlig ausgetrocknet.

C. Herstellung der Kieselgelsäure:

1. Die gewaschene und getrocknete Glassäule wird an einem Stativ befestigt, die Glasfritte mit einem kreisrunden Filterpapier (Durchmesser 1,6 cm) bedeckt.
2. 10 g des getrockneten und erkalteten Kieselgels werden unter ständigem

Klopfen der Säule in diese eingefüllt. Hierbei muss langsam gefüllt und kräftig geklopft werden, um eine gleichmässige Verteilung des Kieselgels zu erreichen. (Es besteht sonst die Gefahr einer späteren Blasenbildung). Um Volumänderungen der Kieselgelsäule zu vermeiden (Risse), wird der Glaszylinder an einen Thermostat angeschlossen (26° C.).

3. Eine weitere Verdichtung des Kieselgels erreicht man durch Anbringen einer Wasserstrahlpumpe, die mindestens 5 - 6 Stunden saugen soll.
4. Nach Entfernung der Wasserstrahlpumpe bedecken wir das Kieselgel mit einem weiteren Filter.
5. Die fertig hergestellte Säule wird nun zur Vorbereitung für die Aufnahme des Lipoidextraktes nacheinander mit folgenden Flüssigkeitsmengen beschickt:
 - a) 10 ml Äther
 - b) 30 ml Äther - Aceton (Verhältnis 1:1)
 - c) 10 ml Äther
 - d) Petroläther, der bis zur Aufnahme des Extraktes durch die Kieselgelsäule läuft. (Absorption von Luftblasen.

Zu beachten ist,

1. Das Kieselgel darf, sobald es mit Flüssigkeit beschickt worden ist, nicht mehr mit der Luft in Berührung kommen. (Gefahr von Blasenbildung)
2. Ein neues Lösungsmittel darf erst dann eingefüllt werden, wenn der Flüssigkeitsspiegel des vorhergehenden nicht höher als 1 mm über der Kieselsäule steht. (Gefahr der Vermischung und damit Verfälschung der Lösungsmittel).

II. Herstellung des Lipoidextraktes

A. Gewinnung des Leberextraktes (19):

1. Schlachten der Tauben und Entfernen der Leber, die in Eiswasser gelegt und auch im weiteren Verlauf zur Stabilisierung der Fermente, ständig gekühlt wird.
2. Säubern der Leber von Bindegewebe und grobes Zerschneiden.
3. Abwägen:
Pro Syntheseansatz sind 2,4 ml Supernatant (= Überstand bei der folgenden Homogenisierung) erforderlich, wobei 2,4 ml Sup. rund 2,4 g Leber entsprechen. Pro Säule benötigt man 5 Ansätze.
4. Homogenisieren. Die grob zerschnittene Leber wird nun in mehreren Portionen unter Zusatz von Puffer mit einem Handhomogenisator homogenisiert. (Potter - Elvejum)
5. Berechnung der erforderlichen Puffermenge: (Pufferzusammensetzung: 0,085 m Na_2HPO_4 , 0,009 m NaH_2PO_4 , 0,07 m KHCO_3 , pH = 7,4)
Die Berechnung der Puffermenge erfolgt nach empirisch ermittelten Werten, indem das Lebergewicht mit dem Faktor 1,2 multipliziert wird. Puffermenge (ccm) = Lebergewicht x 1,2

6. Zentrifugieren in der Kältezentrifuge:

- a) Zentrifugieren bei 2000 Umdrehungen pro Minute. Dauer 45 Minuten
- b) Der Überstand wird abgegossen, die empirisch berechnete Verlustmenge durch Pufferzugaben ersetzt.

Lebergewicht $\times 4$ = Menge, auf die der Überstand mit Puffer aufgefüllt werden muss.

- c) Zentrifugieren des Überstandes bei 12000 Umdrehungen. Dauer 75 Minuten.

7. Der hierbei gewonnene Überstand kann jetzt zur Incubation im Warburg verwendet werden.

B. Synthese und Reinigung der Lipide

1. Incubation. Der Überstand wird im Warburg incubiert, wobei pro Ansatz zugesetzt werden 0,1 ml MgC 12, 0,006 m Endkonzentration
0,1 ml Na - Citrat, 0,01 m Endkonzentration
0,4 ml C₁₄H₃COOH, 0,008 m Endkonzentration
(1-C₁₄ Acetat mit 110000 Imp/Min.)

2,4 ml Encympräparat

Fettsäuremengenzusatz je nach Versuchsanordnung (siehe Versuchstabellen)

Die in Alkohol gelösten Fettsäuren pipetiert man in die Warburgkölben ein. Der Alkohol wird im Trockenschrank bei 110°C zum Verdampfen gebracht. Unter Zugabe der oben aufgeführten Lösungen wird das Reaktionsgemisch 3 Stunden bei einer konstanten Temperatur von 38°C im Warburg durchgeschüttelt.

2. Reinigung der Lipide. Nach Beendigung der Incubation erfolgt eine Denaturierung der Eiweissfermentsysteme durch Zugabe von Methanol. Dabei werden pro 1 ml des Reaktionsgemisches (- Gesamtinhalt des Warburgkölbens, meist 2,5 Ansätze + 3 ml Aqua dest. als Nachspülung) 8,3 ml Methanol gerechnet. Die Trennung der Lipide von den ausgefällten Eiweissbestandteilen wird durch Lösung der Lipide in Chloroform erreicht. Man rechnet pro ein ml Reaktionsgemisch 9 ml Chloroform. Um eine völlige Ausfällung des Eiweiss zu erreichen, lässt man das Reaktions-Methanolgemisch kurz aufkochen. Nach dem Abkühlen der Lösung wird erneut Chloroform hinzugegeben (Pro 1 ml Serum 6,4 ml Chloroform). Die ausgefällten Eiweissbestandteile werden nun abfiltriert und die gewonnene Lösung in einem 1000 ml Messkolben aufgefangen. Um den Filterrückstand völlig von noch anhaftenden Lipiden zu befreien, spülen wir mit einem Methanol - Chloroformgemisch im Verhältnis 1:2 nach. (Menge pro Ansatz 20 ml Methanol + 40 ml Chloroform). Der Gesamtinhalt des Zylinders wird gemessen und ein Fünftel des festgestellten Mengenwertes an CaCl₂ Lösung (20 mg ad 100 ml Aqua dest.) zugeführt. Die Mengen errechnen sich nach Sperry (20). Die sich bildenden Phasen müssen 10 Min. lang kräftig verrührt werden.

3. Einengung der Lipoide.

Über Nacht setzen sich erneut zwei Phasen ab. Die obere (Methanol, Wasser, CaCl_2 , restliches Eiweiss und Mineralsalze) wird mittels einer Wasserstrahlpumpe restlos abgesaugt, da sich gerade in der Schicht 1/2 cm über der unteren Phase nach unseren Erfahrungen die Haupt-Verunreinigungen absetzen. Die Zylinderwände über der unteren Schicht spülen wir anschliessend mit der oberen Phase eines am Vortage hergestellten Gemisches, das sich folgendermassen zusammensetzt:

- a) 64,2 ml Chloroform
- b) 32,1 ml Methanol
- c) 23,7 ml Calciumchlorid

Man kann diese Mengen beliebig vervielfachen. Die durch das Nachspülen erneut entstehende obere Phase wird ebenfalls abgesaugt.

Die untere Phase muss nun in einem Destilliergerät bei Temperaturen bis 50°C eingengt werden. Bei Temperaturen über 50° besteht die Gefahr der Hydrolyse und Verseifung. Folge: Bildung freier Fettsäuren, die mit noch vorhandenen Ca^{++} Seifen bilden und beim Messen nicht mehr erfasst werden können. (Nachgewiesen an Hand von Vergleichsversuchen).

Nach Eindampfen der gesamten unteren Phase wird der Zylinder nochmals mit einem Methanol-Chloroformgemisch im Verhältnis 1:2 (50 ml Methanol - 100 ml Chloroform) nachgespült und die Flüssigkeit im selben Kolben eingedampft. Zur Entfernung des restlichen Wassers geben wir noch 50 ml Äthylalkohol hinzu. Wenn die gesamte Flüssigkeit eingedampft ist, befindet sich der Lipoidextrakt als Rückstand im Kolben. Das untere Ende der verwendeten Siedekapillare wird abgebrochen und im Verdampfungskolben belassen.

III. Chromatographische Trennung der Lipoide.

A. Pipettieren der Lipoide auf die Säule

1. Lösung des Extraktes

Die Aufnahme der Lipoide aus dem Kolbenrückstand erfolgt durch Lösung in 2 x 2 ml Petroläther.

2. Diese Lösung wird nun, nach Absaugen des über der Kieselgelsäule stehenden Petroläthers (siehe Kap. I) vorsichtig aufgetragen. Die Lösung muss ohne N_2 - Anschluss langsam in das Kieselgel eindringen.

3. Nachspülen des Kolbens mit weiteren 3 x 2 ml Petroläther. Sind die ersten 2 x 2 ml eingesickert, werden diese ebenfalls auf die Säule gebracht.

B. Auftrennung des Lipoidextraktes

1. Folgende Lipoide werden mit den entsprechenden Lösungsmitteln heraus-

gelöst:

- a) Cholesterinester mit 300 ml 1% Äther in Petroläther
- b) Triglyceride mit 250 ml 4% Äther in Petroläther
- c) Freies Cholesterin mit 150 ml 20% Äther in Petroläther
- d) Diglyceride und Carotinoide mit 70 ml 20% Äther
- e) Phosphorlipide mit 300 ml Methanol.

2. Dabei ist folgendes zu beachten:

- a) Auf die Säule wird ein Vorratsbehälter aufgesetzt, der die einzelnen Lösungsmittel aufzunehmen hat. Um eine bestimmte konstante Tropffrequenz zu erreichen, wird das Lösungsmittel unter Druck gesetzt. Zu diesem Zweck wird an den Vorratsbehälter ein mit N₂ Gas gefüllter Gummiballon angeschlossen.
- b) Bei einer Durchlaufgeschwindigkeit von 50 ml pro Stunde wird eine optimale Elution aller Fraktionen erreicht (2). Mit Hilfe des Hahnes am Ausfluss der Säule stellen wir eine Tropffrequenz ein, die dieser Durchlaufgeschwindigkeit entspricht.
- c) Die optimale Elution setzt eine konstante Temperatur von 26°C voraus. Die Säule wird daher, wie schon angeführt, an einen Thermostaten angeschlossen.

IV. Messung der Fraktionen

A. Eindampfen und Normierung der Fraktionen

- 1. Zur völligen Verdampfung der Lösungsmittel stellt man die einzelnen Fraktionen in ein heisses Wasserbad.
- 2. Der so gewonnene Lipoidrückstand, in Petroläther gelöst und filtriert, wird in ein 25 ml Kölbchen überpipetiert und bis zur Markierung mit Petroläther aufgefüllt.

B. Bestimmung der Lipoide

I. Quantitative Bestimmung

- 1. Messung der Aktivitäten im Methandurchflussgerät (Zähler)
 - a) Nach der Methode von Entenmann et al. giessen wir auf die vorgemessenen, mit "Lenspaper" belegten Aluminiumplättchen mit Rand ($\varnothing$ 25 mm) 1 ml der normierten Lösung.
 - b) Die Radioaktivität der völlig getrockneten Plättchen (pro Fraktion werden 3 Plättchen gegossen) wird nun im Methandurchflusszähler durch zweimaliges Messen (Messdauer jeweils eine Minute) direkt bestimmt.
 - c) Aus allen gemessenen Werten bestimmen wir den Mittelwert.
 - d) Zur Korrektur der Messwerte benutzen wir C14 - Standartfolien (Uranstrahler; Normalimpulszahl 8×10^3 Imp./Min.). Der gewonnene Mittelwert ist auf die Normalimpulszahl der Standartfolie umzurechnen.
- 2. Bestimmung der Gesamtaktivität eines jeden Versuches nach der Methode

von Brady und Gurin (Verseifung); Messung erfolgt in einem Oszillationszähler. Der dabei gewonnene Wert wird mit dem durch Summierung der einzelnen Fraktionen erhaltenen Aktivitätswert verglichen.

3. Gewichtsbestimmung der synthetisierten Lipide

- a) Wägeschälchen werden im Trockenschrank auf 80°C erwärmt und anschließend in einem mit CaCl₂ gefülltem Exsiccator zum Erkalten gebracht.
- b) Das Leergewicht des Schälchens wird bestimmt.
- c) In jedes Schälchen pipettiert man 5 ml der normierten Lösung. Das Lösungsmittel wird durch Verdampfen im Trockenschrank völlig entfernt. Anschließend wieder Aufbewahrung der Schälchen im Exsiccator. Mindestdauer: 30 - 45 Minuten.
- d) Gewichtsbestimmung der Lipide durch Subtraction des Leergewichtes der Schälchen vom Bruttogewicht.

II. Qualitativer Nachweis der Lipide

1. Cholesterin nach Zak (21) mit der FeCl₃ Reaktion (22)
2. Veresterte Fettsäuren nach Rapport und Alonso (23). Als Standart wird Triolein (Merck, Bestellnummer 8361) verwendet.
3. Freie Fettsäuren in 3 ml Heptan nach Dole (24) titriert.
4. Carotinoide sind von uns nicht eigens nachgewiesen worden, sie befinden sich jedoch nach Zöllner und Kirsch (2) in der 4. Fraktion.
5. Phosphorlipide: Nachweis mit Molybdat nach Bartlett (25).

VERSUCHSBESCHREIBUNG

Verwendete Geräte:

1. Thermostat
Ulfrathermostat; Gebr. Haak Berlin.
2. Zählgerät, Frieske Hoepfner FH 49
3. Methandurchflusszähler FH 51
4. Chromatographische Säulen nach Hirsch Ahrens

Verwendete Lösungsmittel:

Methanolum pro analysi (Merck)

Acetonum " " "

Chloroformium " "

(mit 1% abs. Alkohol)

Äther aethylicus pro analysi (Merck)

Abs. Alkohol " " "

Benzinum Petrolei " "

(Siedebereich 40 - 70°)

Kieselsäure nach Mallinokrodt (Serva Heidelberg) 100 Mesh

Zu den folgenden Tabellen:

Die folgenden Tabellen bringen die aus mehreren Versuchen gewonnenen Mittelwerte der rel. Aktivität, (gemessen in Impulsen pro Minute), des Lipoidgewichtes (gemessen in mg) und die daraus berechneten Ergebnisse: Hemmung und Förderung der rel und spez. Aktivität und des Lipoidgewichtes.

Die Prozentzahlen sind bezogen auf den Kontrollversuch ohne Fettsäurezusatz (100%).

CAPRYLSÄURE (C8)

Hemmung = H

Förderung = F +

Versuch Nr.	Frak- tion	Zusatz Fett- säuren	rel. Ak- tivität	H. /F. der rel. Akti- vität	Spez. Aktivi- tät	H. /F. der spez. Aktivität	Gewicht	H. /F. des Lipoid- gewichtes
	I	ohne	354	$\hat{=}$ 100 %	2210	$\hat{=}$ 100 %	0,8mg	$\hat{=}$ 100 %
46	I	5mg	221	+ 80 %	2453	+ 11 %	0,45mg	43,8%
47	I	10mg	195	45 %	930	58 %	1,05mg	+ 31,2%
48	I	15mg	203	+ 40 %	880	60 %	1,15mg	+ 44 %
49	I	20mg	153	+ 30 %	730	66,9%	1,05mg	31,2%
50	I	40mg	122	50 %	488	77,9%	1,25mg	+ 56 %
	II	ohne	25254	$\hat{=}$ 100 %	45000	$\hat{=}$ 100 %	3,2 mg	$\hat{=}$ 100 %
46	II	5mg	33878	+ 34 %	80500	+ 79 %	2,1 mg	34,3%
47	II	10mg	32897	+ 30 %	84500	+ 88 %	1,95mg	39 %
48	II	15mg	16917	1 %	49900	+ 10 %	1,7 mg	47 %
40	II	20mg	22442	11 %	46700	+ 4 %	2,4 mg	25 %
50	II	40mg	956	63 %	2510	44 %	1,9 mg	40,5%
	III	ohne	7501	$\hat{=}$ 100 %	47000	$\hat{=}$ 100 %	0,8 mg	$\hat{=}$ 100 %
46	III	5mg	5379	29 %	48700	+ 3,8%	0,55mg	31 %
47	III	10mg	7286	3 %	33000	29,7%	1,1 mg	+ 37,5%
48	III	15mg	4240	8 %	21200	55 %	1,0 mg	+ 25 %
49	III	20mg	3357	55 %	18600	60,4%	0,9 mg	+ 12,5%
50	III	40mg	161	78,6%	1240	73,8%	0,65mg	18,6%
	IV	ohne	2161	$\hat{=}$ 100 %	108050	$\hat{=}$ 100 %	0,1 mg	$\hat{=}$ 100 %
46	IV	5mg	2178	+ 1 %	36200	66,5%	0,3 mg	+200 %
47	IV	10mg	1625	25 %	23100	81,2%	0,4 mg	+300 %
48	IV	15mg	1143	85 %	19000	82,4%	0,3 mg	+200 %
49	IV	20mg	814	89 %	16200	85 %	0,25mg	+150 %
50	IV	40mg	33	99,6%	820	92,4%	0,2 mg	+100 %
	V	ohne	10624	$\hat{=}$ 100 %	21900	$\hat{=}$ 100 %	2,45mg	$\hat{=}$ 100 %
46	V	5mg	13304	+ 25 %	22500	+ 28 %	2,95mg	+ 21,5%
47	V	10mg	9970	+ 6 %	17800	18,7%	2,8 mg	+ 15 %
48	V	15mg	7022	44 %	16750	23,5%	2,1 mg	13,5%
49	V	20mg	5772	46 %	14430	34 %	2 mg	18,5%
50	V	40mg	2462	96,4%	580	97,4%	2,15mg	11,4%

PELARGONSÄURE (C9)

Hemmung = H
Förderung = F +

Versuch Nr.	Frak- tion	Zusatz Fett- säuren	rel. Ak- tivität	H. /F. der rel. Akti- vität	Spez. Aktivi- tät	H. /F. der spez. Aktivität	Gewicht	H. /F. des Lipoid- gewichtes
	I	ohne	509	$\hat{=}$ 100 %	2320	$\hat{=}$ 100 %	1,1 mg	$\hat{=}$ 100 %
41	I	5mg	232	52 %	1105	52,5%	1,05mg	4,5%
42	I	10mg	53	90,6%	265	88,7%	1,0 mg	9,5%
43	I	15mg	443		2330	82 %	0,95mg	6,3%
44	I	20mg	133		578	75,1%	1,15mg	+ 4,5%
45	I	40mg	126		485	79,1%	1,3 mg	+ 18 %
	II	ohne	23391	$\hat{=}$ 100 %	83500	$\hat{=}$ 100 %	1,4 mg	$\hat{=}$ 100 %
41	II	5mg	19934	15 %	71000	15 %	1,4 mg	0 %
42	II	10mg	7184	70 %	24000	71,2%	1,5 mg	+ 7 %
43	II	15mg	4302		16500	80 %	1,3 mg	7 %
44	II	20mg	2142	90,8%	10710	87 %	1,0 mg	28,5%
45	II	40mg	788	96,7%				
	III	ohne	5118	$\hat{=}$ 100 %	73000	$\hat{=}$ 100 %	0,35mg	$\hat{=}$ 100 %
41	III	5mg	4374	15 %	31200	57,5%	0,7 mg	+100 %
42	III	10mg	1692	68 %	9400	87,1%	0,9 mg	+157 %
43	III	15mg	2432		22100	69,7%	0,55mg	+ 57 %
44	III	20mg	1576	70,2%	17500	76 %	0,45mg	+ 28,5%
45	III	40mg	97	98 %	108	98,5%	0,45mg	+ 28,5%
	IV	ohne	747	$\hat{=}$ 100 %	18670	$\hat{=}$ 100 %	0,2 mg	$\hat{=}$ 100 %
41	IV	5mg	480	35,7%	9600	48,5%	0,25mg	+ 25 %
42	IV	10mg	293	60,8%	4880	74,0%	0,3 mg	+ 50 %
43	IV	15mg	163		3260	82,6%	0,25mg	+ 25 %
44	IV	20mg	55	92,6%	1375	92,6%	0,2 mg	0 %
45	IV	40mg	45	94 %	2250	87,5%	0,1 mg	50 %
	V	ohne	4419	$\hat{=}$ 100 %	13400	$\hat{=}$ 100 %	1,65mg	$\hat{=}$ 100 %
41	V	5mg	3778	14,5%	14500	+ 8 %	1,3 mg	21,2%
42	V	10mg	1887	57,3%	5720	57,5%	1,65mg	0 %
43	V	15mg	263		2360	82,4%	1,8 mg	+ 10 %
44	V	20mg	332	92,5%	830	93,8%	2,0 mg	+ 21 %
45	V	40mg	86	97,4%	286	97,8%	1,5 mg	9,1%

CAPRINSÄURE (C10)

Hemmung = H

Förderung = F +

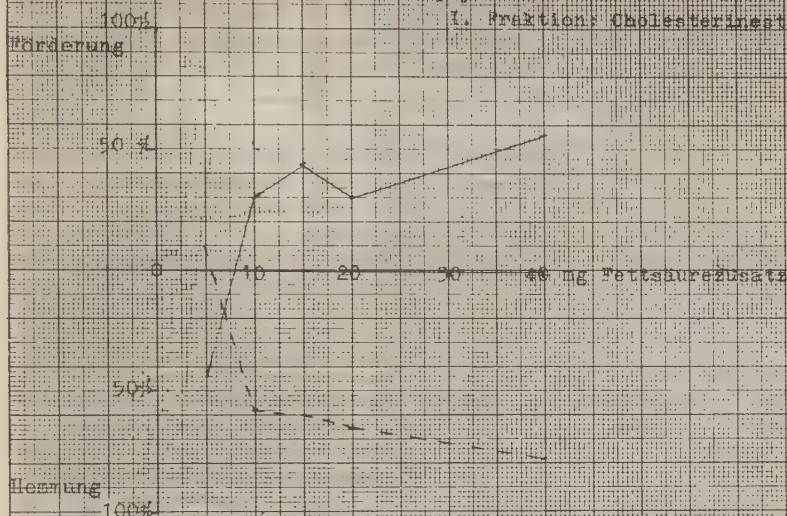
Versuch Nr.	Frak- tion	Zusatz Fett- säure	rel. Ak- tivität	H. /F. der rel. Akti- vität	Spez. Aktivi- tät	H. /F. der spez. Aktivität	Gewicht	H. /F. des Lipoid- gewichtes
	I	ohne	3094	$\hat{=}$ 100 %	11450	$\hat{=}$ 100 %	1,35mg	$\hat{=}$ 100 %
51	I	5mg	3600	+ 16 %	10600	7 %	1,7 mg	+ 26 %
52	I	10mg	1961	36 %	6330	45 %	1,55mg	+ 15 %
53	I	15mg	747	76 %	4150	64 %	0,9 mg	33,5%
54	I	20mg	88	97 %	880	92,8%	0,5 mg	63 %
55	I	40mg	3	99 %	43	96,3%	0,35mg	74 %
	II	ohne	35142	$\hat{=}$ 100 %	46800	$\hat{=}$ 100 %	3,75mg	$\hat{=}$ 100 %
51	II	5mg	15799	55 %	23900	49 %	3,3 mg	12 %
52	II	10mg	13048	63 %	19500	58,4%	3,35mg	10,5%
53	II	15mg	5613	84 %	8620	82,6%	3,25mg	13,5%
54	II	20mg	2407	93 %	3860	91,9%	3,2 mg	14,5%
55	II	40mg	1981	95 %	2910	95,8%	3,4 mg	9,5%
	III	ohne	5080	$\hat{=}$ 100 %	28200	$\hat{=}$ 100 %	0,9 mg	$\hat{=}$ 100 %
51	III	5mg	9128	+ 80 %	43500	+ 54 %	1,05mg	+ 16,7%
52	III	10mg	4823	40 %	21900	22 %	1,1 mg	+ 22 %
53	III	15mg	4040	+ 5 %	19200	32 %	1,05mg	+ 12 %
54	III	20mg	716	86 %	10230	63,8%	0,35mg	61,1%
55	III	40mg	314	94 %	3490	87,7%	0,45mg	50 %
	IV	ohne	1326	$\hat{=}$ 100 %	16550	$\hat{=}$ 100 %	0,4 mg	$\hat{=}$ 100 %
51	IV	5mg	606	51 %	6060	63,4%	0,5 mg	+ 25 %
52	IV	10mg	344	39 %	3125	81,1%	0,55mg	+ 38 %
53	IV	15mg	178		890	94,5%	1,0 mg	+150 %
54	IV	20mg	108		2160	86,8%	0,25mg	37,5%
55	IV	40mg	101		3370	79,4%	0,15mg	62,5%
	V	ohne	3587	$\hat{=}$ 100 %	11200	$\hat{=}$ 100 %	1,6 mg	$\hat{=}$ 100 %
51	V	5mg	2491	30 %	6222	44,5%	2 mg	+ 25 %
52	V	10mg	1416	60 %	3010	73,1%	2,35mg	+ 47 %
53	V	15mg	724	80 %	1960	82,5%	1,85mg	+ 11,5%
54	V	20mg	239	94 %				
55	V	40mg	167	95,5%				

Zu den folgenden Kurven:

Die Kurven bringen einen graphischen Vergleich der Hemmung oder Förderung der spez. Aktivität und des Lipoidgewichtes bei verschieden zugesetzten Fettsäuremengen unter Berücksichtigung der einzelnen gewonnenen Fraktionen.

Caprylsäure

I. Fraktion: Cholesterinester

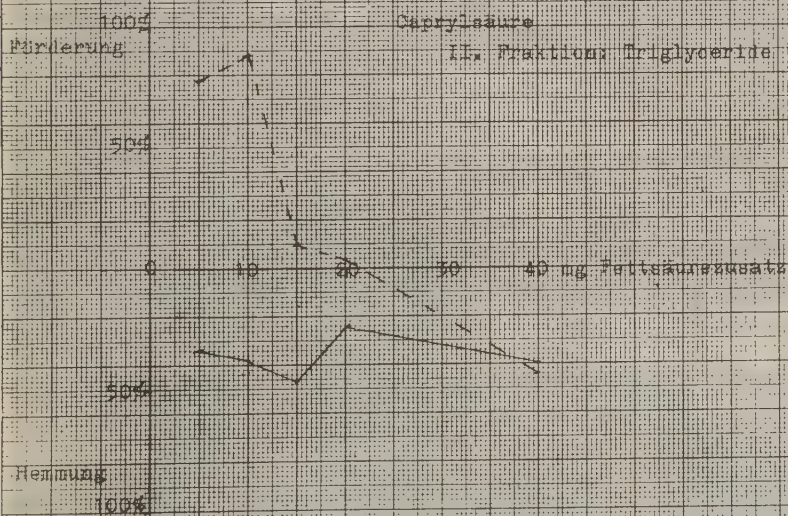


Lipidsynthese

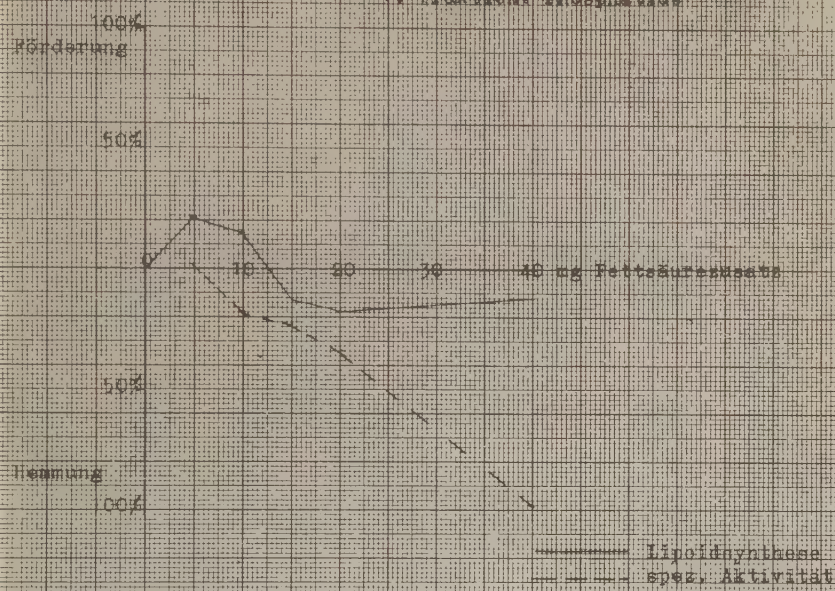
spezifische Aktivität

Caprylsäure

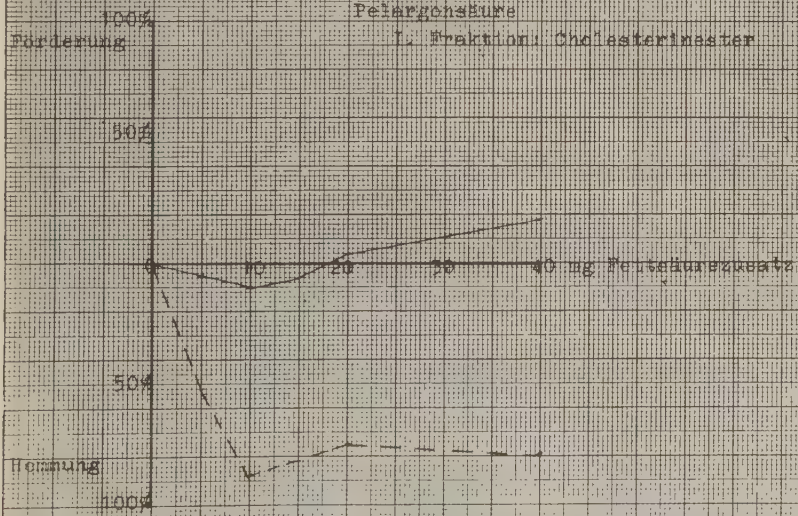
II. Fraktion: Triglyceride

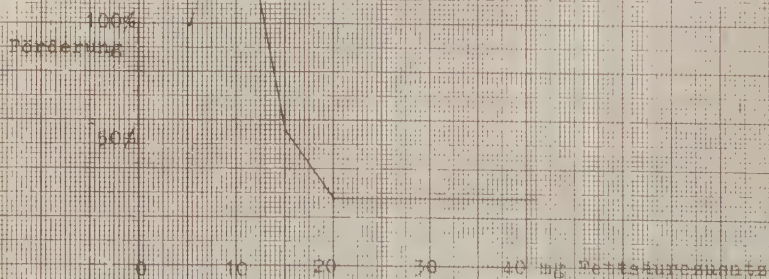
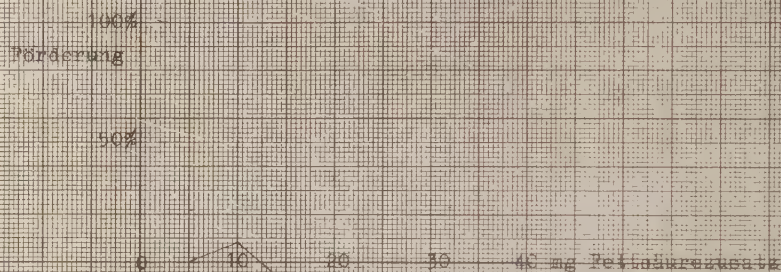


31
 Caprylsäure
 V. Fraktion: Phosphatide



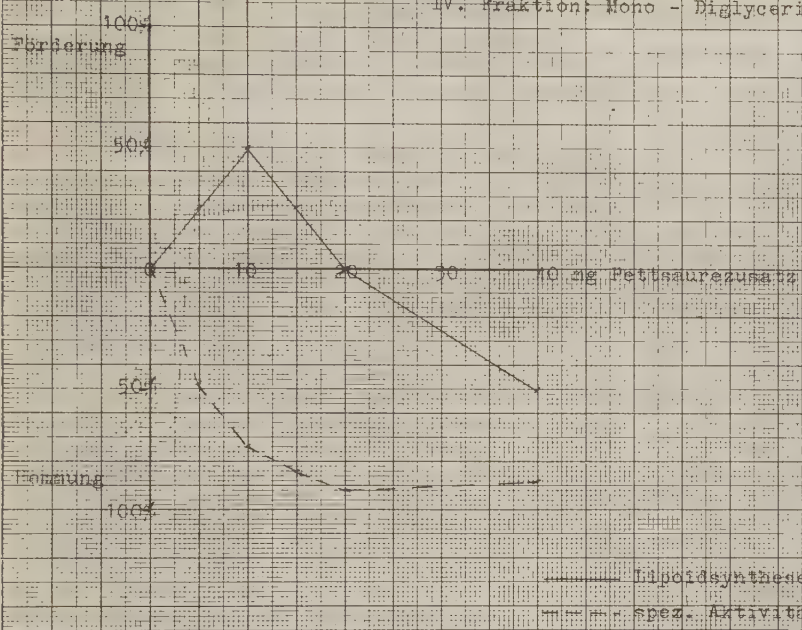
32
 Pelargonsäure
 I. Fraktion: Cholesterinester





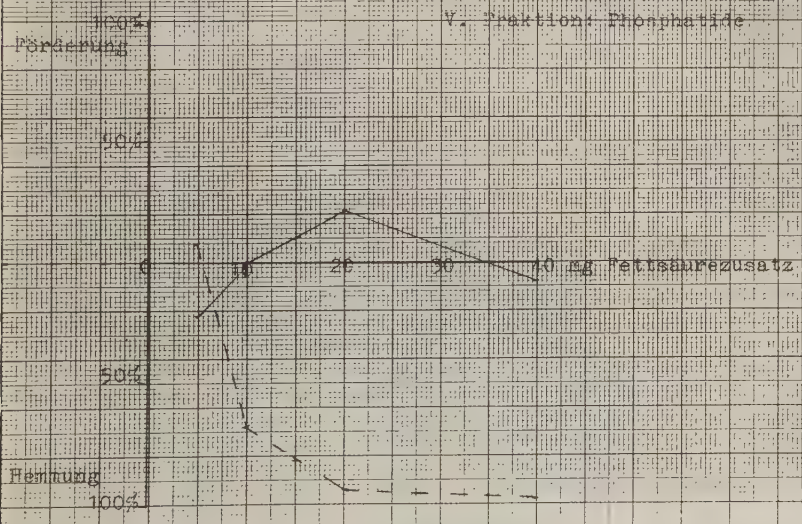
Pelargonsäure

IV. Fraktion: Mono - Diglyceride



Pelargonsäure

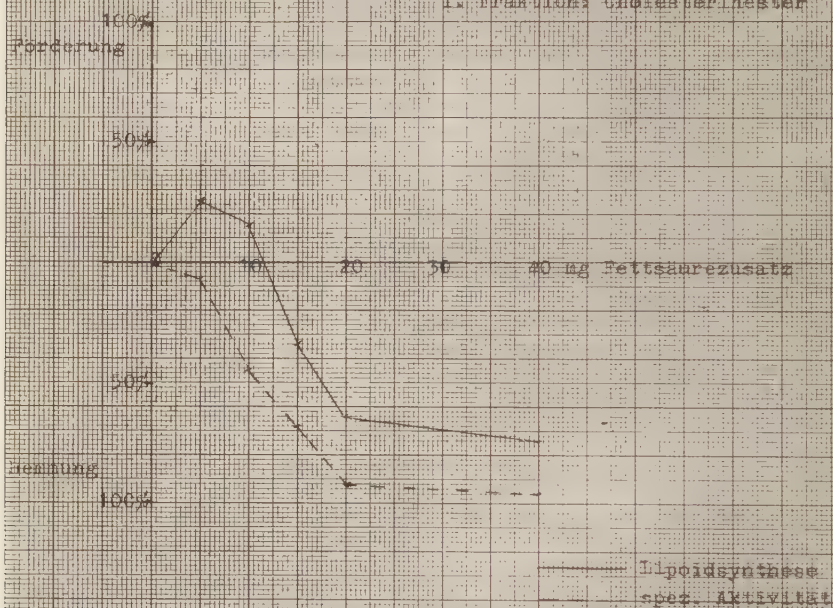
V. Fraktion: Phosphatide



34

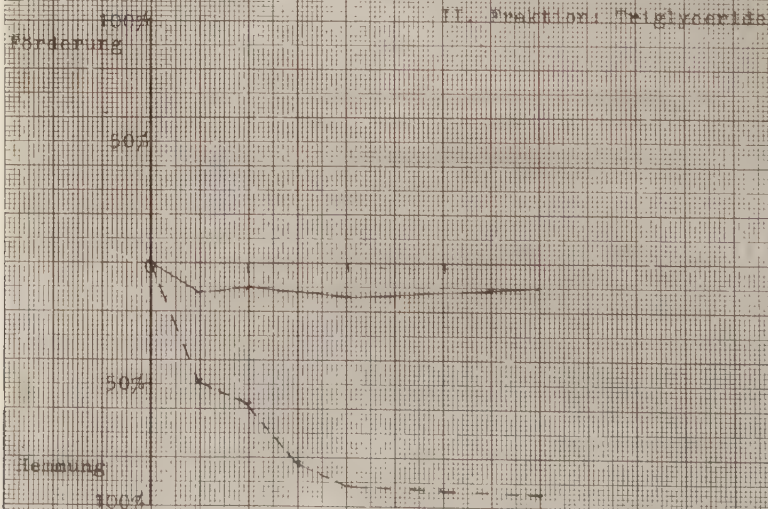
Caprinsäure

I. Fraktion: Cholesterinester



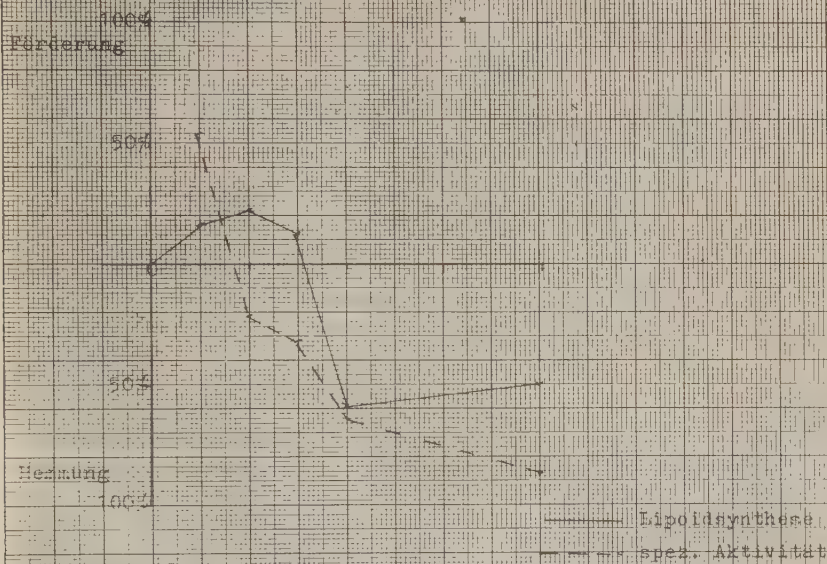
Caprinsäure

II. Fraktion: Triglyceride



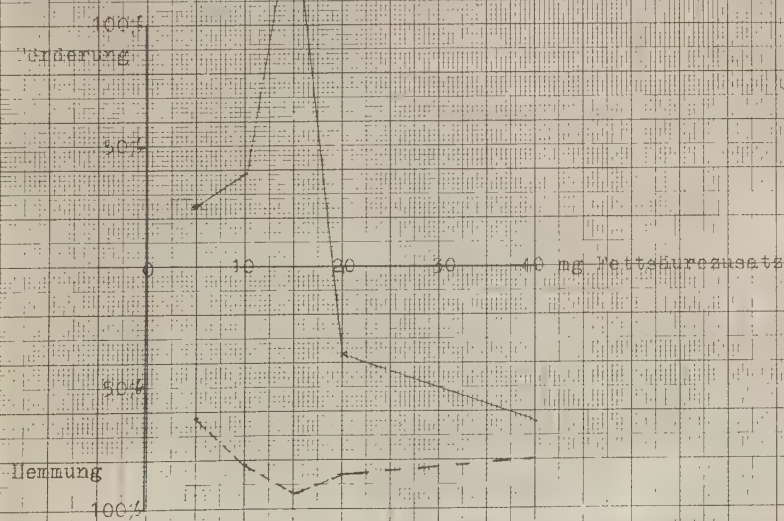
Caprinsäure

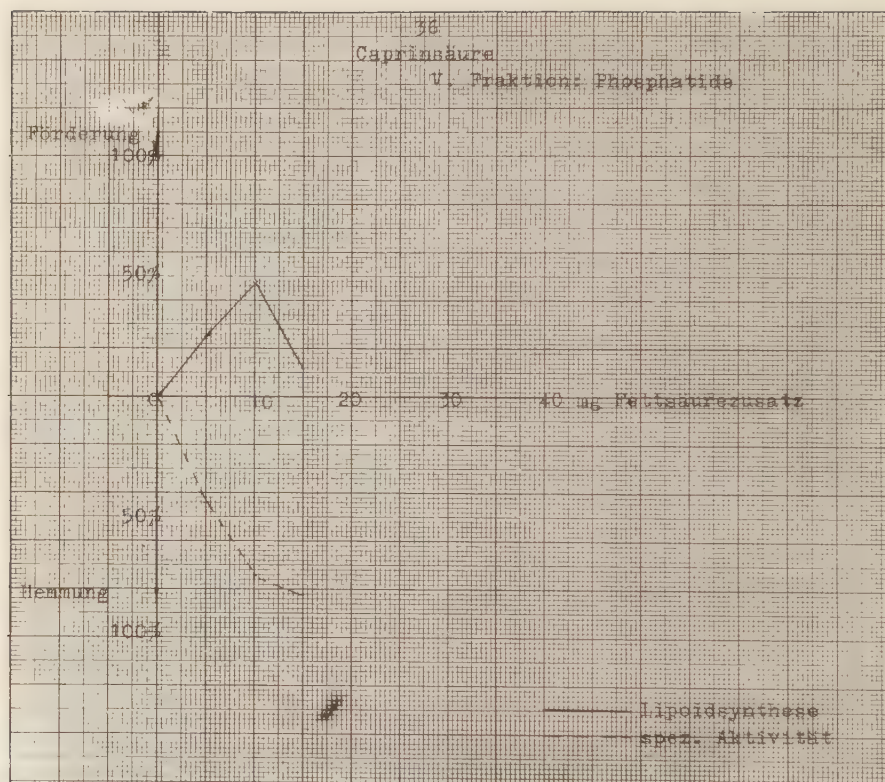
III. Fraktion: freies Cholesterin



Caprinsäure

IV. Fraktion: Mono - Diglyceride





VERSUCHSERGEBNISSE UND DISKUSSION

I. ALLGEMEINER TEIL:

Es ist notwendig, gleich am Beginn der Diskussion der Versuche ein Ergebnis vorwegzunehmen und zu besprechen, das sich bei all unseren Versuchen mit grosser Deutlichkeit gezeigt hat.

Man kann auf Grund eines verringerten Einbaus von aktivem Acetat in die Lipoidfraktionen, in Gegenwart von Fettsäuren, nicht allgemein von einer Hemmwirkung dieser Fettsäuren auf die invitro Lipidsynthese sprechen.

Wir fanden bei physiologisch noch zumutbaren Konzentrationen der zugegebenen Fettsäuren, eine gewichtsmässige Förderung der Fettsynthese, obwohl gleichzeitig die Aktivität, gemessen in Impulsen pro Minute, stark abnahm.

Wie kann man nun diesen immer wieder bestätigten Vorgang erklären?

Die Grundlage unseres Versuches ist der Einbau von aktivem Acetat in die Lipoidfraktionen, also in Cholesterin, Fettsäuren und Phosphatide. Diesen Vorgang benutzte man zur Messung der Zu- oder Abnahme der einzelnen Fraktionen. Der Einbau des aktiven Acetates kann nur in Gegenwart eines diese Reaktion katalysierenden Fermentsystems erfolgen. Nun ist jedoch ein wesentliches Charakteristikum aller biochemischen Fermentsysteme, dass sie jeden Vorgang in zwei Richtungen katalysieren. (Begründung siehe Einleitung: Gleichgewicht). Voraussetzung ist allerdings, dass das Energieniveau in keine Richtung hin verändert wird. Wenn also ein Fermentsystem des Lipoidauf- und abbaus zwei Richtungen zu katalysieren vermag, so heisst das auf unseren Fall bezogen, dass sowohl aus zugegebenem Acetat Fettsäuren aufgebaut werden können, wie auch zugegebene Fettsäuren zu Acetat abgebaut werden können.

Die Bildung von Fettsäuren aus aktivem Acetat ist längst bekannt und in der Literatur vielfach bestätigt. Katz und Chaikoff (32) fanden bei Verwendung von aktivem Acetat, den Einbau desselben in die nichtflüchtigen Verbindungen der Mäuseleber. Brown et al. (33) bestätigten diesen Vorgang bei Versuchen an der Ziegenleber.

Den rückläufigen Vorgang, die Aufspaltung aktiver Fettsäuren in Bruchstücke und deren Verwendung in der Lipidsynthese, fanden Supravat, Mukherje, Kunitake et al. (34) bei Versuchen mit Rattenleber - Homogenaten, denen sie 1 - C₁₄ - Palmitat zufügten. Eine gewisse Menge der aktiven Substanzen wurde in das freie Cholesterin eingebaut. Die Autoren begründen diesen Vorgang als Ergebnis einer Biosynthese von kleinen Mengen radioaktiven Cholesterins aus C₂ Fragmenten, die ja nur vom Abbau des eingesetzten 1 - C₁₄ - Palmitates herkommen können.

Ausserdem konnten wir auch in eigenen Versuchen mit aktivem Palmitat zeigen, dass sich eine gewisse Menge Aktivität im freien Cholesterin wiederfand. Das bedeutet jedoch eine Aufspaltung des Palmitats bzw. der Palmitinsäure in C₂ - Bruchstücke; denn nur aus solchen ist der Aufbau des Cholesterins möglich.

Es dürfte also als nachgewiesen gelten, dass zugegebene Fettsäuren bei invitro Versuchen durch die, bei uns z.B. im Leberhomogenat vorhandenen Fermentsysteme in Acetatbruchstücke abgebaut werden.

Bei unseren Versuchen liegt nun die Sache wie folgt: Im Ansatz des Kontrollversuches, auf den sich die Versuche mit Fettsäuren beziehen, stehen zur Lipidsynthese ausser den entsprechenden Grundstoffen wie Glycerin usw. nur aktives Acetat zur Verfügung und wird in einer bestimmten Masse eingebaut. Bei den Versuchen, bei denen die Wirkung der zugegebenen Fettsäuren studiert wurde, kommt es, wie oben klargelegt, zu einer Aufspaltung derselben in Acetatbruchstücke. Nach dem Massenwirkungsgesetz (siehe Einleitung) wird durch die Zugabe der Fettsäuren das Fettsäure - Acetat - Gleichgewicht gesetzmässig zugunsten des Acetats eingestellt (d.h. Fettsäuren werden in C2 Fragmente aufgespalten).

Der Lipidsynthese werden nun also, ausser aktivem Acetat, auch inaktives angeboten. Je stärker also die Aufspaltung von Fettsäuren zu Acetat ist, und sie wird bis zu einer optimalen Konzentration der zugegebenen Fettsäuren ständig ansteigen, umso mehr wird das aktive Acetat verdünnt, umso geringer wird die Chance eines solchen Moleküls, in ein Lipid eingebaut zu werden.

Auf diese Weise dürfte sich der Abfall der Aktivität, selbst bei zunehmender Lipidsynthese, erklären.

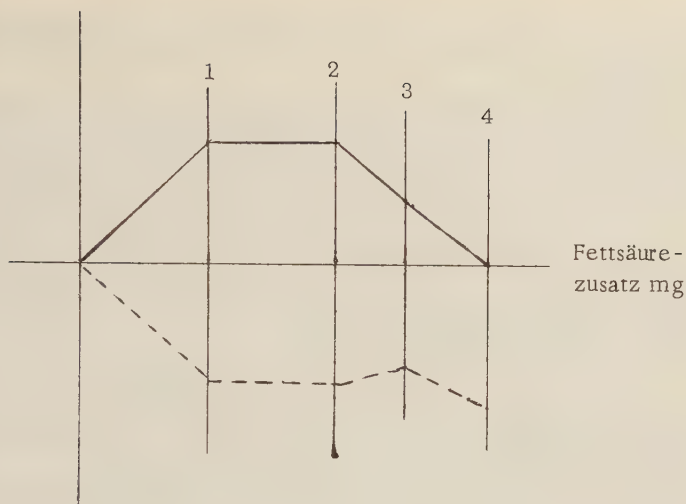
Um ein Mass für die Grösse und das Verhältnis des Einbaus aktiver und inaktiver Bruchstücke in die Lipide zu gewinnen, was uns rückläufig wieder Aussagen über die Wirkung der zugegebenen Fettsäuren machen lässt, bestimmten wir auch die spezifische Aktivität, d.h. die Aktivität in Impulsen pro Minute / pro ein Milligramm der isolierten und inaktiven Substanz.

Theoretisch können durch die spezifische Aktivität auf Grund der oben angeführten Betrachtungen folgende Aussagen gemacht werden:

1. Starker Abfall der spezifischen Aktivität bei steigender, gleichbleibender oder leicht abfallender Lipidsynthese kann verursacht werden:
 - a) Durch eine Abnahme des Einbaus von aktivem, bei gleichzeitig vermehrter Verwendung in inaktivem Acetat;
 - b) durch Einbau ganzer Fettsäureketten, die zugesetzt wurden.
2. Eine Zunahme der spezifischen Aktivität im Hemmungs- oder Förderungsbereich weist auf einen erhöhten Einbau von aktivem Acetat hin, dessen Ursache:
 - a) in einer Verlängerung der zugesetzten Fettsäuren mittels der zugefügten aktiven C2 Bruchstücke,
 - b) in einem Abbaustopp der zugesetzten Fettsäuren infolge irgendwelcher Stoffwechselhemmungen zu suchen ist.

Zur Verdeutlichung möchten wir folgende Kurve anführen und erklären:

Förderung %



Hemmung %

— Lipoidsynthese
 ---- spez. Aktivität

1. Bis zu diesem Punkt steigt die Lipoidsynthese steil an, während die spezifische Aktivität fällt, d. h. es werden zur Synthese in zunehmendem Masse inaktive Substrate verwendet.

2. Bis hierher verläuft die Synthese ausgeglichen, das Verhältnis zwischen Ab- und Einbau der Fettsäuren hat sich auf einen bestimmten Wert eingestellt.

3. In diesem Bereich wird der Abbau der Fettsäuren bereits gehemmt (Hemmung durch Substratüberschuss usf.) Da hier nur wenige oder keine inaktiven Bruchstücke zur Verfügung stehen, kann mehr aktives Acetat eingebaut werden. Die Aktivität steigt, obwohl die Lipoidsynthese, die ja vorwiegend auf die zugeführten Fettsäuren angewiesen ist, abfällt.

4. Fällt nun sowohl die Lipoidsynthese als auch die spezifische Aktivität in diesem Masse, so ist das ein Zeichen, dass nun eine echte Hemmung vorliegt. Es werden weder Fettsäuren gespalten noch welche aufgebaut.

II. CAPRYLSÄURE (C8)

Die Caprylsäure, eine mittelkettige, gesättigte Fettsäure, ist in der Nahrung enthalten und muss vom Organismus verwendet werden. Da jedoch bekannt ist, dass mittelkettige Fettsäuren in den Fetten der Fettgewebe praktisch nicht vorkommen, eine Ausnahme macht die Haut, verfütterten Weitzel und Schön (35) Glyceride von Capryl-, Caprin- und Dodecansäuren an Ratten und untersuchten da-

nach die Leber und die Fettdepots auf den Gehalt an diesen Fettsäuren. Sie fanden dabei folgendes:

Mittelkettige Fettsäuren (C8 - C11) finden sich weder im Organfett der Leber noch in den Fettdepots des Körpers. Der einzige Ort, wo sie überhaupt und zwar in sehr geringen Mengen vorkommen, ist die Haut. Hierbei lagert sich C8 nur in der Cutis ein, während C10 bereits in der Subcutis zu finden ist.

Lorber, Cock und Meyer (37) führten an Ratten Versuche mit Caprylsäure, die an COOH mit C13 und an C7 mit C14 markiert waren, durch. Sie konnten dabei einen totalen β - oxydativen Abbau und einen teilweisen Übergang der C2 - Bruchstücke in Kohlenhydrate nachweisen.

Die mittelkettigen Fettsäuren werden also, wie aus diesen Versuchen hervorgeht, nur in sehr geringem Umfang in das Leberfett eingebaut. Der grösste Teil von ihnen wird demnach in der Leber in C2 - Bruchstücke abgebaut, verbrannt oder an Träger gebunden vom Blut ausgeschwemmt.

Wenn wir diese Ergebnisse auf unsern Versuch übertragen, so heisst das, dass der Hauptteil der zugegebenen Caprylsäure vom Fermentsystem des Leberhomonogenates zu C2 - Bruchstücken abgebaut wird. Die Folge müsste ein starker Abfall der spezifischen Aktivität sein. Eine zweite Möglichkeit wäre die Verlängerung der Caprylsäure durch angehängte Acetatbuchstücke zu C16 und C18 Säuren. Das würde bedeuten, dass die spezifische Aktivität nur in geringem Masse abfällt, ja dass wir sogar eine Förderung erwarten könnten. Ein Abtransport der Caprylsäure kommt bei unserem Versuch nicht in Frage.

Nun wollen wir einmal unsere Versuchsergebnisse nach diesen Gesichtspunkten hin untersuchen.

1. Fraktion: Cholesterinester

Die Kurve der Cholesterinestersynthese steigt im Bereich zwischen 5 und 10 mg sehr stark an und hat bei 15 mg einen optimalen Synthesepunkt. Im gleichen Bereich fällt die spezifische Aktivität sehr stark ab; d.h. hier werden die aktiven Moleküle des Acetates durch inaktive sehr verdünnt.

Bei der Konzentration von 15 mg zeigen die Fermentsysteme der Cholesterinestersynthese ungefähr eine Auslastung. (Turnover = Wechselzahl der Fermente wird ganz beansprucht; siehe Einleitung). Die Synthese steigt auch bei grösserer Fettsäurezugabe nicht mehr stark an.

Dabei ist zu beachten, dass die Caprylsäure nicht als ganze C8 - Kette an das Cholesterin verestert wird (siehe allgem. Teil), sondern zuerst in Bruchstücke zerlegt wird, aus denen dann längerkettige Fettsäuren z.B. Palmitinsäure aufgebaut werden. Charakteristisch für die Aufspaltung der Caprylsäure ist der Abfall der spezifischen Aktivität. Ob das caprylsäureabspaltende Ferment und das Ferment, welches längerkettige Fettsäuren aufbaut, synonym sind oder zwei grundverschiedene Fermentsysteme darstellen, ist umstritten.

2. Fraktion: Triglyceride

Diese Fraktion müssen wir unter dem Gesichtspunkt betrachten, dass hier eine Steigerung der Lipidsynthese in der Hauptsache durch eine erhöhte Bindung von Fettsäuren an das Glycerin der Leber zustande käme. Hier wäre also die Möglichkeit vorhanden, dass die zugegebene Caprylsäure nach Aktivierung direkt an das Glycerin gebunden und dann durch die zugegebenen Acetatbruchstücke zu C16 und zu C18 Säuren verlängert würde.

Von den von uns untersuchten Triglyceridfraktionen zeichnet sich die des Versuchs mit Caprylsäure dadurch aus, dass sie innerhalb der mehrfach wiederholten Versuche starke Schwankungen aufwies. Besonders die spezifische Aktivität im Bereich niedriger Konzentrationen. Diese Instabilität der Caprylsäure wurde schon in früheren Arbeiten des Labors erkannt.

Die zweite Fraktion bei den Caprylsäure - Versuchen zeigt eine absolute Hemmung der Lipidsynthese, mit einer bei niedrigen Konzentrationen hohen, dann aber sehr rasch abfallenden spezifischen Aktivität. Das heisst, durch die zugegebenen Fettsäuren wird die Synthese herabgesetzt, jedoch gleichzeitig in hohem Masse aktives Acetat eingebaut.

Für den Einbau der ungespaltenen Caprylsäure an das Glycerin ergibt sich also kein Anhaltspunkt, da sonst die Gesamtsynthese gesteigert sein müsste. Auf der anderen Seite ist jedoch die Diglyceridsynthese (4. Fraktion) und somit die Vorstufe der Triglyceride und Phosphatide in hohem Masse gefördert. Es wäre die Möglichkeit zu discutieren, ob die Syntheszeit, für die wir immer drei Stunden ansetzten, in diesem speziellen Fall zu kurz ist, um eine genügende Syntheseförderung herbeizuführen. Weitere Versuche müssen hier noch Klärung schaffen.

3. Fraktion: Cholesterin

Die Bildung von freiem Cholesterin erreicht bei Zugabe von 10 mg Caprylsäure ein Maximum, fällt dann jedoch linear ab und kommt ungefähr bei 30 mg in Bereiche absoluter Hemmung. Die spezifische Aktivität sinkt gerade wieder in dem Bereich stark ab, in dem die Hauptförderung der Lipidsynthese vorliegt; das heisst wiederum, dass bei Zugabe von 10 mg ein Optimum der Substratkonzentration für das Fermentsystem erreicht wird, das hier seinen grössten Umsatz zeigt, sowohl in Beziehung auf die Bildung neuer Produkte (Cholesterinsynthese) als auch in Bezug auf den Abbau der zugegebenen Caprylsäure (Verdünnung der spezifischen Aktivität).

Ab 10 mg laufen die Kurven der Lipidsynthese und der spezifischen Aktivität parallel zueinander und zwar fallen sie ab. Das bedeutet, dass sowohl die aufbauenden als auch die abbauenden Fermentsysteme im gleichen Masse gehemmt werden, so dass das Verhältnis zwischen aktivem und inaktivem Acetat gleich bleibt.

Da wir es hier mit der freien Cholesterinfraktion zu tun haben, die ja nur aus freien Acetatbruchstücken aufgebaut werden kann, spricht der starke Abfall

der spezifischen Aktivität und die kräftige Förderung der Lipoidsynthese für die Annahme, dass die Caprylsäure in der Leber grösstenteils gespalten wird.

4. Fraktion: Diglyceride und Carotinoide

Ob die Vogelleber in der Lage ist Carotinoide aufzubauen, konnten wir nicht in Erfahrung bringen.

Der Diglyceridfraktion kommt insofern Bedeutung zu, da sie nach neueren Erkenntnissen die Vorstufe sowohl der Triglyceride als auch der Phosphatide darstellt. (Kornberg und Pricer (38); Weiss und Kennedy (39); Stein und Shapiro (40).)

Die Synthesekurve der Diglyceride zeigt dementsprechend bei 10 mg Fettsäurezugabe eine Förderung von rund 300%. Auch hier fällt die Kurve der spezifischen Aktivität bis 10 mg sehr steil ab, also auch hier bis 10 mg eine kräftige Aufspaltung der Caprylsäure. Ein Einbau der Caprylsäure mit darauffolgender Kettenverlängerung mit aktivem Acetat bis zur Palmitinsäure würde einen viel sanfteren Abfall der spezifischen Aktivität zur Folge haben.

Die hohen Synthesewerte der 4. Fraktion zeigen uns auch, dass zum Zeitpunkt der künstlichen Syntheseunterbrechung (3 Stunden nach erfolgter Incubation) die Synthese der Triglyceride noch nicht voll im Gang war. Es wäre vielleicht von Nutzen, in folgenden Versuchen die Lipoidsynthese der einzelnen Fraktionen, bei bestimmten Fettsäurekonzentrationen, nach verschieden langer Incubation im Warburg chromatographisch zu untersuchen.

5. Fraktion: Phosphorlipide

Die Phosphorlipide, die umstrittene Transportform der Fettsäuren, zeigen bei den Versuchen mit Caprylsäure ein Synthesemaximum, das zwischen 5 und 10 mg liegt. Ab 10 mg finden wir auch hier den für die Caprylsäure charakteristischen Abfall der Lipoidsynthese. Bei höheren Fettsäurezugaben kommt es zu einer ständigen Hemmung.

Auffällig ist bei diesem Versuch, dass die spezifische Aktivität sehr flach abfällt; d. h. es kommt zum Einbau von aktivem Acetat. Dabei ist der Bereich zwischen 10 und 20 mg interessant. Hier verläuft, obwohl die Phosphorlipidsynthese kräftig abfällt, die Kurve der spezifischen Aktivität sehr flach; d. h. aktives Acetat wird weiterhin in gleichem Masse eingebaut. Das könnte dafür sprechen, dass der Abbau der Caprylsäure gehemmt wird, während ein verminderter Aufbau mit dem bereits vorhandenen aktiven Acetat weiterläuft.

Man könnte in diesem Fall an folgendes denken: der Abbau der Caprylsäure und der Aufbau zu C16, C18 und C22 Säuren in der Leber erfolgt über zwei getrennte spezifische Fermentsysteme. Bei dem einen, und zwar bei dem der Caprylsäure, setzt die Hemmung durch Substratüberschuss bereits bei niedrigeren Konzentrationen ein. Dadurch wird der Abbau der Caprylsäure zu Acetat gestoppt. Bei dem anderen Fermentsystem tritt dieser Vorgang erst bei höheren Konzentrationen ein. Das Ferment ist also in der Lage noch zu arbeiten, wenn das andere schon gestoppt

ist. Da kein inaktives Acetat geliefert wird, muss vermehrt auf das aktive zurückgegriffen werden. Folge: der schwache Abfall der spezifischen Aktivität.

Vergleich der Fraktionen untereinander

Das Gemeinsame der Fraktionen liegt darin, dass sie alle zwischen 5 und 10 mg Caprylsäurezugabe ihr Synthesemaximum aufweisen. Eine Ausnahme bildet die Fraktion des freien Cholesterins, die zwar auch ihren Hauptanstieg dort hat, jedoch dann langsam weiter ansteigt; und die Fraktion der Triglyceride, deren Lipidsynthese ständig in dem selben Mass gehemmt ist.

Die Hemmung der Lipidsynthese setzt bei der 3. 4. und 5. Fraktion immer in dem selben Bereich zwischen 10 und 20 mg ein. Worauf beruht nun diese Hemmung? Wir wollen hier eine Möglichkeit discutieren.

Es ist die Hemmung eines Fermentsystems durch Substratüberschuss (siehe Einleitung). Die Grösse des Substratüberschusses, die zur Hemmung führt, ist natürlich für jedes Fermentsystem verschieden. Für diese Annahme spricht, dass die Hemmung gerade bei den Fraktionen bei ungefähr derselben Konzentration auftritt, deren Lipidsynthese im Wesentlichen von der Bildung von Fettsäuren abhängig ist (3. 4. 5. Fraktion). Eine Ausnahme macht auch hier die 2. Fraktion.

Die spezifische Aktivität zeigt überall, bis auf die zweite Fraktion, eine Hemmung. Dabei fällt auf, dass die Hemmung der ersten und vierten Fraktion sehr ähnlich sind. Sie zeigen beide bis 10 mg einen steilen Abfall. Bei der dritten und fünften Fraktion läuft die Aktivitätskurve flach linear abfallend.

III. PELARGONSÄURE (C9)

Die Pelargonsäure nimmt unter den untersuchten mittelkettigen Fettsäuren eine Sonderstellung ein. Sie ist nämlich eine unphysiologische, ungeradzahlige Fettsäure und kann vom Organismus nicht aufgebaut werden. Nachdem sie einen Fremdkörper darstellt, wird sie sofort in Acetatbruchstücke aufgespalten. Dabei kommt es zu einer Anhäufung des letzten Bruchstückes, nämlich der Propionsäure (C3).

Es ist nun interessant, einiges über das Verhalten der Propionsäure im Organismus zu erfahren.

Feller D. D. (41) führte Untersuchungen mit C14 - Propionat an Mäusen durch. Er stellte fest, dass die Leber mit dem Propionat fast nichts anfangen kann. Er beobachtete nur einen geringen totaloxydativen Abbau der Propionsäure. Im Gegensatz dazu ist der Umbau von Propionat im Fettgewebe 100 bis 200 mal grösser als in der Leber. Der Autor nimmt auf Grund seiner Versuche an, dass es im Fettgewebe einen speziellen Weg des Aufbaus von Fettsäuren aus Propionsäure geben müsse, den die Leber nicht kennt (42). Bei Verfütterung von aktivem Propionat fand er 90% im Fettgewebe wieder, während die Leber fast völlig frei war.

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Chung, Hueter et al. (43). Sie unter-

suchten die Verwendung von Butyrat, Valeriat und Propionat in der Kuhleber. Dabei stellten sie fest, dass Butyrat in nichtflüchtige Verbindungen der Leber aufgenommen wird, allerdings sehr langsam. Aktive Valeriansäure wurde rasch und in grossem Umfang in der Leber verwendet und fand sich in allen chromatographisch aufspaltbaren Lipoidfraktionen. Das Propionat wurde in der Leber fast nicht um oder eingebaur, sondern höchstens oxydiert.

Mc Carthy, Shaw und Laksmanan (44) stellten durch Versuche an einer durchströmten Ziegenleber fest, dass aktives Valeriat und Butyrat von der Leber völlig aufgenommen wurden und in Acetat aufgespalten wurden. Der Acetatspiegel stieg dabei mässig an und die aktiven Substanzen fanden sich zum Teil in neugebildeten Fetten, vor allem in den Phosphatiden, zum Teil in den Kohlenhydraten wieder. Bei Durchführung mit Propionat wurde dieses zwar zum Teil oxydiert, jedoch nicht weiter verarbeitet.

Nehmen wir nun wie einige Autoren an, dass die Propionsäure in der Leber nicht oder nur sehr gering verwendet werden kann und in der Hauptsache in das Fettgewebe abtransportiert wird, so bedeutet das für unseren Versuch, wo die Abtransportmöglichkeit wegfällt, dass es zu einer Anreicherung von Propionsäure kommen muss. Propionsäure soll jedoch nach Lang (26) eine Hemmwirkung auf den gesamten Stoffwechsel haben. Vielleicht kann man diese zusätzliche Hemmwirkung verantwortlich machen für die in unserem Labor bereits früher festgestellte stärkere Hemmwirkung ungeradzahlicher gegenüber denen ihnen vergleichbaren geradzahlichen Fettsäuren.

1. Fraktion: Cholesterinester

Die Lipidsynthese ist im Anfangsteil etwas gehemmt, bei höheren Konzentrationen dann gering gefördert. Die Ursache an der das liegen kann, möchte ich beim Vergleich der Fraktionen diskutieren. Insgesamt gesehen ist bei der Cholesterinestersynthese nichts Bedeutendes zu erwähnen. Die spezifische Aktivität zeigt im Bereich bis 10 mg einen starken Abfall, d. h. es ist auch hier zu einer kräftigen Aufspaltung der Pelargonsäure in Acetatbruchstücke gekommen, die ihren Höhepunkt ungefähr bei 15 mg erreicht und dann gleich bleibt.

Hier möchte ich kurz auf einen wichtigen Vorteil der Chromatographie gegenüber anderen Untersuchungsmethoden eingehen, die nur eine Gesamtbetrachtung der Lipide zulassen (Verseifung usw.) Es hat sich bei unseren Versuchen vielfach gezeigt, dass z. B. die Verseifung eine Förderung der Gesamtlipide anzeigte, während wesentliche Fraktionen, z. B. die zweite Fraktion, gering gehemmt werden. Eine allgemeine Förderung der Lipide bei Versuchen, die nach der Methode der Verseifung durchgeführt werden, bedeutet also nicht, dass alle Fraktionen gefördert sein müssen.

2. Fraktion: Triglyceride

Auffällig ist auch bei der 2. Fraktion die geringe Lipidsynthese. Wir haben zwar eine kleine Förderung im Bereich von 10 mg, sie verwandelt sich jedoch bald in eine ständig zunehmende Hemmung.

Die spezifische Aktivität fällt dort, wo die Lipidsynthese etwas gefördert ist, stark ab. Bei höheren Konzentrationen verläuft die Hemmung der spezifischen Aktivität parallel zu derjenigen der Lipidsynthese. Das bedeutet, dass eine Fermentblockierung eingetreten sein muss und das Verhältnis des Einbaus von aktiven und inaktiven Bruchstücken sich stabilisiert hat.

3. Fraktion: freies Cholesterin

Die 3. Fraktion zeigt einen hohen Einbau von inaktiven Substanzen im Bereich niedriger Konzentrationen bis etwa 10 mg. Das hat zur Folge, dass:

- a) die Lipidsynthesekurve stark ansteigt,
- b) die Kurve der spezifischen Aktivität steil abfällt.

Steigert man die Pelargonsäurekonzentration, so geht die Synthese von einem entsprechenden Punkt rasch zurück. Es liegt jedoch immer noch eine Förderung vor. Die spezifische Aktivität steigt gleichzeitig stark an, d. h. es werden weniger Bruchstücke angeliefert. Das kann folgendermassen erklärt werden:

Da ja hier reines Cholesterin aufgebaut wird, besteht die Möglichkeit, dass trotz früher einsetzender Hemmung des Säureabbaus das Fermentsystem der Cholesterinsynthese bei diesen Konzentrationen weiterarbeitet. Für die Synthese stehen aber nur in geringem Masse aktive Bruchstücke zur Verfügung. Diese werden eingebaut. Folge: spezifische Aktivität steigt an.

Das vorhandene aktive Material ist jedoch zu gering, um die Lipidsynthese auf der Höhe zu halten, wo sie sich in Konzentrationsbereichen befindet, in denen noch eine Aufspaltung der Fettsäuren erfolgt. Deshalb muss die Lipidsynthese abfallen.

4. Fraktion: Diglyceride

Die Lipidsynthese ist bis zu einer Konzentration von 10 mg gefördert, dann kommt es zu einem Abfall der Kurvenwerte. Bei 20 mg beginnt die absolute Hemmung. (bei 40 mg bereits 50%).

Die spezifische Aktivität fällt bis 10 mg steil ab, womit wieder die Theorie vom Einbau inaktiver Bruchstücke bestätigt wird. Bei hohen Konzentrationen steigt die spezifische Aktivität seltsamerweise wieder etwas an.

Wie bereits erwähnt, stellen die Diglyceride die Vorstufe für die Phosphatide und Triglyceride dar. Das bestätigt sich für die Triglyceride dadurch, dass Förderung und Hemmung in der 2. und 4. Fraktion so ziemlich parallel verlaufen. Der prozentmässig höhere Ausschlag der 4. Fraktion ist sicher dadurch bedingt, dass diese Fraktion gewichtsmässig viel kleiner ist und hier deshalb geringe Veränderungen bereits grosse Kurvenausschläge bedingen.

5. Fraktion: Phosphorlipide

Wie bei den übrigen Fraktionen finden wir bei 20 mg die höchste Synthese, während die spezifische Aktivität hier steil abfällt. Im Gegensatz zu den anderen Fraktionen fällt die Lipidsynthese nur sehr langsam ab. Die spezifische Aktivität behält ab 20 mg ihre Position.

Auffallend ist die Hemmung der Lipidsynthese bei 5 mg und die gleichzeitig geförderte Aktivität. Vielleicht liegt in diesem Bereich, in dem die anderen Fraktionen hohe Synthesewerte zeigen, eine Konkurrenzreaktion vor, bei der die anderen Fraktionen eine höhere Affinität zu den Bruchstücken der Pelargonsäure zeigen.

Vergleich der einzelnen Fraktionen der Pelargonsäureversuche untereinander.

Gemeinsam haben die einzelnen Fraktionen der Pelargonsäure den steilen Abfall der spezifischen Aktivität bis ca. 10 mg, was auf einen starken Abbau der Pelargonsäure hindeutet. Die Fettsynthese ist in diesem Bereich immer gefördert. Eine Ausnahme macht die Fraktion des freien Cholesterins, die in diesem Bereich absinkt.

Zu diskutieren wäre die Möglichkeit, dass zwischen der 1. und 3. Fraktion insofern eine Verschiebung aufgetreten ist, als hier weniger synthetisiertes freies Cholesterin in Cholesterinester übergeführt worden ist. Es zeigt sich bei der Pelargonsäure im Allgemeinen, dass die Neubildung von Fettsäuren im Vergleich zur Caprin- und Caprylsäure geringer ist. Man beachte vor allem die Unterschiede der 4. Fraktionen. Auffallend ist im übrigen noch die Ähnlichkeit der Kurven der spezifischen Aktivität der 1. und 3. Fraktion.

Die Hemmung der Lipidsynthese setzt bei den einzelnen Fraktionen zwischen 10 und 15 mg ein, mit Ausnahme der Phosphorlipide, die viel flacher abfallen.

Auf die stärkere Hemmwirkung ungeradzahlicher Fettsäuren sind wir bereits eingegangen. Ausser dieser Möglichkeit der Hemmung sind bestimmt noch die Hemmung durch Substratüberschuss und andere Hemmfaktoren beteiligt.

IV. CAPRINSÄURE (C10)

Wie die Capryl- und die Pelargonsäure zählt man die Caprinsäure zu den mittelkettigen Fettsäuren. Sie kommt in der Nahrung, sowohl in pflanzlichen als auch in tierischen Fetten recht häufig vor. Ihr physiologisches Verhalten in der Leber ist ähnlich dem der Caprylsäure. Die Literatur, die ich dort gebracht habe, bezieht sich auch auf die Caprinsäure. Ich möchte sie deshalb hier nicht mehr erwähnen.

Über die einzelnen Fraktionen ist folgendes zu sagen:

1. Fraktion: Cholesterinester

Die Fraktion des freien Cholesterins zeigt bis zu 10 mg eine Steigerung der

Cholesterinsynthese, die ihren Höhepunkt bei rund 5 mg hat. Dann kommt es zu einem kräftigen Abfall; zwischen 5 und 10 mg fällt die Kurve von 25% Förderung auf 50% Hemmung ab. Die spezifische Aktivität nimmt in diesem Bereich auch ab, jedoch ziemlich linear. Spezifische Aktivität und Cholesterinsynthese zeigen einen parallelen Verlauf, d.h. das Einbauverhältnis zwischen aktivem Acetat und inaktivem Acetat bleibt gleich.

Die absolute Hemmung beginnt hier im Bereich zwischen 5 und 10 mg.

2. Fraktion: Triglyceride

Das Syntheseplateau der Triglyceridfraktion ist bei allen Caprinsäurekonzentrationen um etwa 15% gehemmt. Die spezifische Aktivität fällt bis 20 mg sehr rasch ab (90% Hemmung). Das kommt bereits einem totalen Einbaustopp gleich.

Wenn auch in diesem Fall die Lipidsynthese etwas erniedrigt ist, so kann man doch aus dem Vergleich der spezifischen Aktivität und der Triglyceridsynthese den Schluss ziehen, dass auch hier inaktive C₂ - Bruchstücke, die aus der zugegebenen Fettsäure stammen, mit zur Synthese herangezogen wurden, sonst würde die spezifische Aktivität nicht stärker absinken als die Fettsynthese.

3. Fraktion: Cholesterinester

Bei der 3. Fraktion liegt etwa bis 15 mg noch eine Förderung der Lipidsynthese vor. Bei höheren Konzentrationen ist die Synthese gehemmt. Die spezifische Aktivität, die bei 5 mg noch eine starke Förderung zeigt, fällt bei Konzentrationen zwischen 10 und 20 mg sehr stark ab. In dem Bereich, wo beide Kurven den stärksten Abfall zeigen, laufen sie parallel zueinander, was wieder wie bei den Triglyceriden auf eine Hemmung der Synthese hindeutet. Die hohe spezifische Aktivität bei 5 mg, bei gleichzeitiger Förderung der Synthese, zeigt an, dass hier vermehrt aktives Acetat eingebaut worden ist. Eine Begründung dafür kann nicht gegeben werden.

4. Fraktion: Diglyceride

Die Synthese, die bereits bei 5 mg kräftig einsetzt, erreicht eine maximale Grösse von 150% Förderung bei 15 mg Caprinsäurezugabe. Hierauf folgt ein sehr steiler Abfall, der bei 20 mg zu einer Hemmung von ca. 35% führt. Bei noch höheren Konzentrationen nimmt die Synthese weiter ab.

Im Gegensatz dazu fällt die spezifische Aktivität bis 15 mg sehr stark ab (bis 95% Hemmung), steigt jedoch dann in geringem Masse wieder ab. Dieser Vorgang beruht wahrscheinlich auf die unterschiedlichen Konzentrationsempfindlichkeit des Fermentsystems der Caprinsäure und dem einer höheren Fettsäure.

5. Fraktion: Phosphorlipoide

Die Phosphorlipoide sind bis 10 mg Caprinsäurezugabe gefördert, dann kommt es zu einem Abfall. Da uns die Werte zwischen 15 und 40 mg fehlen,

können wir über die Lipidsynthese keine weiteren Aussagen machen. Es dürfte jedoch auch hier, nach den anderen Kurven zu schliessen, mit einer höheren Konzentration zu einem weiteren Abfall kommen.

Die spezifische Aktivität erreicht bereits bei 20 mg eine maximale Hemmung von 95%. Der steile Abfall der spezifischen Aktivität ist wahrscheinlich auf einen vermehrten Abbau der Caprinsäure zurückzuführen.

Vergleich der einzelnen Fraktionen

Gemeinsam haben alle Fraktionen, bis auf die zweite Fraktion, die Förderung ihrer Lipidsynthese im Bereich um 10 mg. Gemeinsam haben alle Fraktionen auch den steilen Abfall der spezifischen Aktivität um 10 mg. Weiterhin zeigen hier alle Fraktionen bis auf die zweite Fraktion eine totale Hemmung der Lipidsynthese, die zwischen 15 und 20 mg einsetzt.

Der Vorgang, der in diesem Bereich gehemmt wird, muss eine Reaktion sein, von der die weitere sehr unterschiedliche Synthese der einzelnen Fraktionen weitgehend abhängt.

Der Ausgangspunkt der Synthese all dieser Produkte ist das aktivierte Acetat. Wird dieses in geringen Mengen angeliefert, so wird die Lipidsynthese einer jeden Fraktion abfallen. Der Hemmvorgang muss also in die Acetatproduktion aus Fettsäuren eingreifen. Das kann nur durch Beeinflussung des Fermentsystems geschehen.

Das Fermentsystem ist im wesentlichen von 3 Faktoren abhängig (siehe Einleitung). Der pH - Wert fällt hier weg, da die pH - Veränderungen, bewirkt durch die zugegebenen Fettsäuren, mit Pufferlösung völlig ausgeglichen wird. Die Temperatur fällt ebenfalls weg, da sie während der gesamten Synthesezeit auf einem optimalen Betrag gehalten wurde. Es bleiben noch die antimetabolischen Einflüsse und hier kommt nach Durchsicht der Möglichkeiten (siehe Einleitung) am ehesten die Hemmung durch Substratüberschuss in Frage. Dafür spricht auch, dass die Hemmung aller Fraktionen ziemlich bei derselben Konzentration einsetzt.

Alle Fraktionen haben im übrigen, in Grenzen gesehen, ein ähnliches Kurvenbild; nur die zweite Fraktion macht eine Ausnahme.

V. VERGLEICH DER CAPRYL-, PELARGON-, UND CAPRINSÄURE

Die mittelkettigen Fettsäuren zeigen eine total andere Reaktion im Organismus als die langkettigen. Nach Weitzel und Schön (36) werden die mittelkettigen Fettsäuren, im Gegensatz zu den langkettigen, nach der Resorption auf dem Blutweg zur Leber gebracht. Der Transport der langkettigen Fettsäuren erfolgt auf dem Lymphweg. Man nimmt an, dass die langkettigen Fettsäuren eine wesentlich grössere Affinität zu den Transportkörpern haben als die kurz- und mittelkettigen Fettsäuren.

Fettsäuren mittlerer Kettenlänge treten im Depotfett und im Leberfett fast nicht auf (ausgenommen Laurinsäure). Sie werden, wie oben beschrieben, grössten-

teils in der Leber in C2 - Bruchstücke aufgespalten, z. T. oxydiert oder weiter-transportiert.

Mit diesen Untersuchungen stimmen unsere Ergebnisse überein. In den Bereichen, wo eine Synthesesteigerung vorliegt, kommt es bei allen Säuren zu einem starken Abfall der spezifischen Aktivität. Es liegt also eine starke Verdünnung der aktiven Bruchstücke durch inaktive vor, Diese sind durch massive Aufspaltung der mittelkettigen Fettsäuren entstanden.

Die Lipoidsynthese hat im Allgemeinen ihr Maximum bei 10 mg Fettsäure-zusatz und fällt dann meist mehr oder weniger stark ab. Ausnahmen bilden die zweiten Fraktionen der Capryl- und Caprinsäuren, die beide total gehemmt sind. Die zweite Fraktion der ungeradzahligen Pelargonsäure zeigt eine geringe Förderung, die allerdings im Bereich der Fehlerquellen liegt.

Die höchste Synthese des Cholesterinesters liegt bei der Caprylsäure vor, es folgt dann die Caprinsäure, während die Pelargonsäure bereits eine Hemmung des Cholesterinesters bewirkt. Dieses "aus der Reihe fallen" der Pelargonsäure wird wahrscheinlich verursacht durch die zusätzliche Hemmwirkung der Propionsäure, die dabei entsteht, oder durch deren Umbauprodukt, die Malonsäure.

Die Kurven der dritten Fraktion sind untereinander sehr ähnlich. Hier zeigt die C9 die höchsten Synthesewerte, es folgt dann die Capryl- und Caprinsäure.

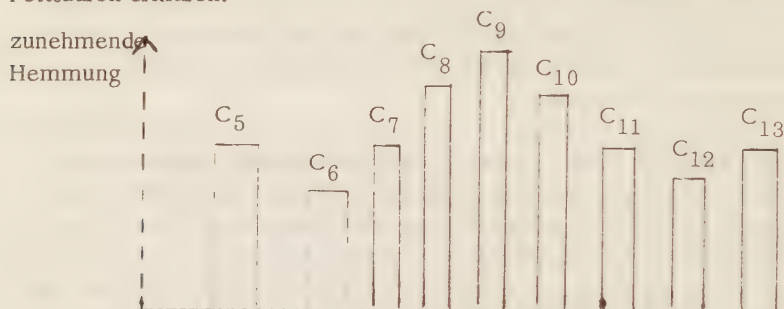
Auch die Fraktionen der Diglyceride sind untereinander sehr ähnlich. Hier zeigt die Caprylsäure die höchste Synthese vor der Caprinsäure und der relativ niedrigen Pelargonsäure. Während C9 und C10 bei 20 mg eine absolute Hemmung aufweisen, zeigt C8 auch bei höchsten Konzentrationen eine Förderung. Bei den Phosphorlipoiden ist der Vorgang genau umgekehrt. Hier zeigt sich bei C8 - Zusatz bei 15 mg eine absolute Hemmung, während bei C10 - Zusatz überhaupt nicht gehemmt wird und bei C9 - Zusatz erst zwischen 30 und 40 mg.

Aus den Synthesegewichtstabellen lässt sich noch folgendes entnehmen. Die stärkste absolute Gesamthemmung weist die Pelargonsäure auf, es folgen dann die Capryl- und Caprinsäure.

Dieses Ergebnis stimmt mit den früheren Untersuchungen des Labors überein. Man bestimmte damals nur die relative Aktivität, der bei einer bestimmten Fettsäurezugabe synthetisierten Fette und stellte fest, dass der Einbau des Acetates am stärksten bei C9 gehemmt wurde, während die Hemmwirkung der C8 und C10 sich ungefähr die Waage hielt. Ähnlich wie wir fand man auch, dass die Caprylsäure bei niedrigen Konzentrationen die relative Aktivität schwächer hemmt als die Caprinsäure, bei höheren Konzentrationen ist der Vorgang umgekehrt.

Wir können das obere Ergebnis heute in ungefähr erläutern. Die Hemmung der relativen Aktivität bei C8- und C10 - Zugabe beruht im Wesentlichen bis zu einer physiologischen Konzentration der zugegebenen Fettsäuren in einem vermehrten Einbau von inaktivem Acetat. Dass gerade die mittelkettigen Fettsäuren C8 - C10 stärker hemmen als z. B. C6 oder C12, beruht darauf, dass sie wie oben erwähnt, eine Sonderstellung im Stoffwechsel insofern einnehmen, als dass sie radi-

kal zu C2 - Bruchstücke aufgespalten werden. Auf die zusätzlich vermehrte Hemmung der Pelargonsäure sind wir bereits eingegangen. Auf ähnliche Weise lässt sich wahrscheinlich die allgemein stärkere Hemmwirkung aller ungeradzahligten Fettsäuren erklären.



Schematische Darstellung des Verhältnisses der Hemmwirkung von Fettsäuren auf die relative Aktivität.

Für die absolute Hemmung der Lipidsynthese, die bei allen mittelkettigen Fettsäuren im Bereich zwischen 10 und 20 mg einsetzt, gibt es mehrere Möglichkeiten zu diskutieren.

a) Die Hemmung durch Substratüberschuss, auf die wir bereits bei der Diskussion der Pelargonsäure eingegangen sind.

b) Hemmung durch entstehende Dikarbonsäuren.

Dazu ist folgendes zu sagen.

Verkade und van der Lee (45) entdeckten 1932 eine äusserst auffällige Erscheinung im Stoffwechsel der Fettsäuren mittlerer Kettenlänge (C8 - C12). Sie beobachteten nach Verabreichung grosserer Mengen dieser Fettsäuren beim Menschen eine geringe Ausscheidung der entsprechenden Dicarbonsäuren im Harn. Flaschen-träger und Bernhard (46) fanden diese Erscheinung auch bei Hunden. Es musste also im Organismus, wahrscheinlich in der Leber, eine -Oxydation stattgefunden haben.

Solche Methyloxydationen treten im biologischen Geschehen häufig auf; z.B. bei Aleyl - Benzolen, sowie bei aliphatischen und cyclischen Isoprenverbindungen; aber auch bei Karbonsäuren, deren normaler Abbau durch Blockierung der Karboxylgruppe behindert ist.

Die -Oxydation der Fettsäuren mittlerer Kettenlänge scheint jedoch eine Ausnahme zu machen. Nach Weichsel (48) ist hier die -Oxydation eine reine Funktion der C - Atomzahl ohne Einführung irgendwelcher Karboxylblockierender Gruppen. Die ausgeschiedene Menge der Dikarbonsäuren ist allerdings gering; sie beträgt bis zu 0% der zugeführten Menge. Die im Harn erscheinenden Dikarbonsäuren haben nicht nur die gleiche Kettenlänge, sondern in der Mehrzahl findet man durch paarigen Abbau ein und mehrfach verkürzte Säuren. Bernhard und Lincke (49),

Es würde nun vor allen Dingen interessieren, ob die Bildung und Anreicherung von Dikarbonsäuren einen hemmenden Einfluss auf die Lipidsynthese haben kann. Eine Hemmwirkung ist bis jetzt nur von der Malonsäure und Oxalsäure bekannt. Die zur Zeit in unserem Labor verlaufenden Versuche scheinen jedoch eine Hemmwirkung der Dikarbonsäuren auf den Lipidstoffwechsel aufzuzeigen. Wenn das der Fall ist, könnte ein Teil der Hemmwirkung mittelkettiger Fettsäuren auf das Konto der Dikarbonsäurebildung kommen. Weitere Versuche müssen hier erst noch Klärung schaffen.

VI. VERGLEICH ZWISCHEN DEN GESÄTTIGTEN UND UNGESÄTTIGTEN, MITTEL (C8 - C10) UND LANGKETTIGEN (C12 - C18) FETTSÄUREN

Mittel-, langkettige und ungesättigte Fettsäuren verhalten sich im Stoffwechsel des Organismus total unterschiedlich. (Die langkettigen und ungesättigten Fettsäuren wurden von uns in der gleichen Weise wie die mittelkettigen untersucht. Die genauen Ergebnisse finden sich in der Arbeit von Ph. Baesken (50).) Ich will nun versuchen die charakteristischen Unterschiede, wie sie sich in den Versuchen ergeben haben, darzustellen.

a) Die mittelkettigen Fettsäuren zeigen im Bereich zwischen 5 und 10 mg eine Steigerung der Lipidsynthese, die jedoch bei grösseren Mengen Fettsäurezugabe stark abfällt und in eine absolute Hemmung übergeht.

Die von uns untersuchte Palmitinsäure verhält sich dahingehend, dass sie ihre optimale Synthese erst bei 40 mg erreicht und dann wieder abfällt.

Bei den ungesättigten Fettsäuren haben wir im Gegensatz zu all den anderen bei höchsten Konzentrationen (bis 80 mg Zusatz), in fast allen Fraktionen noch eine Steigerung der Synthese.

b) Die spezifische Aktivität der mittelkettigen Fettsäuren fällt bei 5 bis 10 mg Säurezugabe im Allgemeinen bis zu hohen Hemmungsgraden ab.

Bei der langkettigen Palmitinsäure finden wir nur eine schwache Hemmung der spezifischen Aktivität, die manchmal sogar in eine geringe Förderung übergeht.

Die spezifische Aktivität der ungesättigten Fettsäuren hat etwa eine Grösse, die zwischen der der mittelkettigen und der der langkettigen Fettsäuren liegt.

Die unterschiedlichen Aktivitätskurven dürften sich, wie bereits bei den einzelnen Fettsäuren beschrieben, folgendermassen erklären:

Die mittelkettigen Fettsäuren werden, wie die Förderung der Lipidsynthese und der Abfall der spezifischen Aktivität zeigt, in grossem Ausmass von den Leberfermenten in C2 Bruchstücke zerlegt. Dadurch wird das Verhältnis des Angebots von aktivem und inaktivem Acetat zugunsten der letzteren verschoben. (Abfall der spez. Aktivität).

Die geringe Hemmung der spezifischen Aktivität bei der Palmitinsäure hat wohl ihre Ursache darin, dass sie als Ganzes in die Lipoidmoleküle eingebaut, also

wenig aufgespalten wird. Sie kann mit C2 - Bruchstücken zu C18 und höheren Fettsäuren verlängert werden, die, da es in der Hauptsache radioaktive Bruchstücke sind, einen langsameren Abfall der spezifischen Aktivität bewirken. Natürlich ist auch eine Neusynthese z. B. von C16 - Säure aus C2 - Bruchstücken möglich.

Ähnliche Verhältnisse, jedoch nicht so stark ausgeprägt, zeigen auch die ungesättigten Fettsäuren in unserem Versuch. Sie werden ebenso als Ganzes eingebaut und zu C20 - C22 Säuren verlängert. Der steilere Abfall der spezifischen Aktivität gegenüber der Palmitinsäure bedeutet, dass weniger aktive Substanz in die Lipidfraktionen eingebaut wurde, also eine stärkere Aufspaltung der Fettsäuren stattfand.

c) Weiterhin ist folgende Beobachtung auffallend.

Bei den mittelkettigen Fettsäuren, mit Ausnahme der Pelargonsäure, finden wir eine totale Hemmung der 2. Fraktion, während die Phosphorlipide zumindest bei niedrigen Konzentrationen, eine deutliche Förderung der Synthese aufweisen.

Bei den langkettigen Fettsäuren finden wir bei höheren Konzentrationen eine Förderung der Synthese der 2. Fraktion vor, während die Phosphorlipide, mit Ausnahme der Linolsäure, eine mässige Hemmung zeigen.

Die zweite und die fünfte Fraktion verhält sich also bei den mittelkettigen Fettsäuren gerade umgekehrt als bei den langkettigen.

d) Die Hemmwirkung, auf deren Ursache wir bereits in den einzelnen Fettsäurekapiteln eingegangen sind, ist bei der Pelargonsäure am ausgeprägtesten, nimmt dann über die beiden mittelkettigen Fettsäuren, die Capryl- und die Caprinsäure, ab. Die langkettige Palmitinsäure zeigt sich auch noch empfindlich, jedoch erst bei hohen Konzentrationen. Die Lino!- und die Linolensäure zeigen selbst bei den höchsten von uns verwendeten Konzentrationen keine Hemmung.

ZUSAMMENFASSUNG

Aufgabe: Die Untersuchung des Einflusses verschiedener Konzentrationen von Pelargon-, Capryl- und Caprinsäure auf die in vitro Synthese von Fetten und Lipoiden.

Untersuchungsmethode: Taubenleberhomogenate + radioaktiv markiertem Acetat + Fettsäurezusatz in bestimmten Mengen ——— Synthese im Warburg ——— Chromatographische Auftrennung in die einzelnen Lipoidgruppen (Cholesterinester, Triglyceride, freies Cholesterin, Mono-, Diglyceride, Phosphatide.) ——— Messung der Aktivität und des Gewichtes.

Versuchsergebnisse:

1. Die Messung der Aktivität ergab, dass die meisten der oben angeführten Lipoidfraktionen bei steigendem Zusatz von Capryl-, Pelargon-, wie auch Caprinsäure eine zunehmende Hemmung zeigten.
2. Das Lipoidgewicht zeigte bei den meisten Fraktionen bei Zusatz von Mengen bis rund 15 mg Fettsäuren eine Förderung, bei höheren Mengen eine zunehmende Hemmung.
3. Daraus ergibt sich: Man kann nicht allein auf Grund der Messung von dem in die Lipide eingebauten radioaktivem Acetat auf eine Förderung oder Hemmung der Synthese schliessen. Die starke Anfangshemmung der Aktivität erklärt sich aus einem Verdünnungsvorgang radioaktivem Acetates durch inaktives aus dem Abbau der zugesetzten Fettsäuren.
4. Bei hohen Mengen von Fettsäurezugabe kommt es zu einer totalen Hemmung der Fettsynthese, die wahrscheinlich ihre Ursachen in einer Hemmung der Fermente durch Substratüberschuss hat.
5. Die spezifische Aktivität gibt uns das Einbauverhältnis von aktivem und inaktivem Acetat in die synthetisierten Lipide pro Gewichtseinheit an, es errechnet sich aus 1. und 2..
6. Aus dem Verhalten der spezifischen Aktivität bei den Versuchen mit mittelkettigen Fettsäuren kann man entnehmen, dass diese, vor allem die Pelargon-säure, durch die Fermentsysteme der Taubenleber in sehr starkem Masse in Acetatbruchstücke aufgespalten werden.
7. Die gemessenen Lipoidgewichte ergaben:
Cholesterinester bei Zusatz von niedrigen Mengen geradzahliger Fettsäuren: Förderung der Synthese, bei Zugabe von ungeradzahligen Fettsäuren: Hemmung der Synthese. Die Triglyceridsynthese wurde durch geradzahlige mittelkettige Fettsäuren schon in geringen Mengen gehemmt, bei Gabe von ungeradzahligen leicht gefördert.
Die Fraktion des freien Cholesterins wird bei niedrigen Fettsäurezugaben bei allen Säuren gefördert. Die Mono- und Diglyceride zeigen bei allen zugesetzten Fettsäuren eine Förderung.

Die Phosphatide zeigen ebenfalls eine Förderung, die bei den ungeradzahligen Fettsäuren allerdings erst bei Gabe von grösseren Fettsäuremengen einsetzt.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Zechmeister und Cholnoky; die chromatographische Absorptionsmethode, Wien 1938.
2. Zöllner, Kirsch, (Zschr. ges. exp. Med. 134 10-28 1960)
3. Rittenberger, Schönheimer, (J. biol. Chem. 121 235-247 1937)
4. Little, Bloch, (J. biol. Chem. 183 33 1950)
5. Wuersch, Huang, Bloch, (J. biol. Chem. 195 439 1952)
6. Lynen und Mitarb., (Angewandte Chemie 70 738 1958)
7. Bloch, (Lipoid Metabolism, Wiley and Sons, New York, London (1960)
8. Braithwaite and Goodwin, (Biochem. 67 12P 1957)
9. Chaikoff, Zilvermit, (Advances in biological medical Physics 1 322 1948)
10. Golmann, Chaikoff, Reinhardt, Entemann, Dauben, (J. biol. Chem. 184 727 1950)
11. Kennedy, Weiss (J. Am. chem. soc. 77 250 1955 und J. biol. Chem. 222 185 193 1956)
12. Stetten, Salcedo, (J. biol. Chem. 156 27 1944)
13. Willstätter und Mitarb. (Ber. 61 886 1928)
14. Ehring, Mc Ehroy, Glass (The mechanism of encym action Baltimor 1954 S. 123)
15. Dixon, (m. Des. Faraday Soc. No. 20 9301 1955)
16. Lineweaver, Burk (Americ. Soc. 56 658 1934)
17. Winzler, (J. cell comp. Physiol. 21 229 143)
18. Dixon, (Biochem. J. 55 161 176 1953)
19. Brady, Gurin, (J. biol. Chem. 196 421 1952)
20. Sperry, (Lipid analysis, Methods of Biochemical Analysis Vol. II 83 ff)
21. Zak und Mitarb. (Amer. J. clin. Path. 24 1307 1954)
22. Zlatkis, Zak, Boyles (J. Lab. clin. Med. 41 486 1953)
23. Rapport, Alonzo, (J. biol. chem. 217 193 1955)
24. Dole, (J. clin. Invest. 35 150 1956)
25. Bartlett, (J. biol. Chem. 234 466 1959)
26. Lang, (Der intermediäre Stoffwechsel 1952)
27. Karrer, (Lehrbuch der org. Chemie 1954)
28. Leuthardt, (Lehrbuch der physiol. Chemie 1959)
29. Sinclair, (Essential Fatty Acides 1958)
30. Netter, (Theoretische Biochemie 1959)
31. Schmitz, (Lehrbuch der chemischen Physiologie 1958)
32. Katz, Chaikoff, (J. biol. Chem. 206 387 1954)
33. Brown et alt. (Cancer Res. 16 509 1956)
34. Supravat, Mukherje, Kunitake et alt. (J. biol. Chem. 91 230 1958)
35. Weitzel und Schön, (Hoppe - Seyler Zschr. 301 1956)
36. Weitzel und Schön, (Hoppe - Seyler Zschr. 303 1956)

37. Lorber, Cook, Meyer, (J. biol. Chem. 181 1949)
38. Kornberg und Pricer, (J. biol. Chem. 204 305 1953)
39. Weiss, Kennedy, (J. Am. chem. Soc. 78 3550 1956)
40. Stein, Shapiro, (Biochem. Biophys. Acta 24 197 1957)
41. Feller, (Proc. soc. Biol. 102 1959)
42. Feller, (Proc. 2nd Internat. Conf. UN: Peaceful use of Atoms energie 25 45 1958)
43. Chung, Hueter et alt., (Proc. soc. Biol. 1959 100 476)
44. Mc Carthy, Shaw, Laksmanan, (Proc. soc. Biol. 1958 99 560)
45. Verkade, Lee, (Proc. Acad. Wetenshap)
46. Flaschenträger, (Helv. chem. acta 1935)
47. Flaschenträger, (Hoppe - Seyler Zschr. 238 1936 221)
48. Weichsel, (Deutsche med. Wochenschrift 75 1950 S. 1616)
49. Bernhard und Lincke, (Fortschr. chem. org. Nat. St. 4 188 - 334 1945)

L E B E N S L A U F

Am 25. August 1936 wurde ich, Peter Vogel, als erster Sohn des praktischen Arztes Dr. Richard Vogel und seiner Ehefrau Erna, geb. Pleyer, in Nürnberg geboren.

Nach dem Tode meines Vaters (1940) erfolgte im Jahre 1944 unsere Evakuierung nach Schödlas bei Münchberg/Ofr., wo ich die Volksschule besuchte. Im Sept. 1947 trat ich in die Oberrealschule Münchberg über, an der ich im Jahre 1957 die Reifeprüfung ablegte. Seit November 1957 studiere ich an der Universität München Medizin. Hier habe ich auch im April 1959 die naturwissenschaftliche Vorprüfung und im April 1960 die ärztliche Vorprüfung abgelegt.

Am 12. Juni 1963 beendete ich die ärztliche Prüfung, der ich mich ebenfalls an der Universität München unterzog.

3'
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

